

Natürliche Kompetenz und Proteinexport in *Bacillus megaterium*
– Grundlagen und biotechnologische Anwendungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Kai Tobias Knuuti

aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn
2. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert
eingereicht am: 25.02.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.05.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Posterbeiträge:

Tobias Knuuti, Martin Gamer, Sarah Wienecke, David Fröde, Constanze Finger, Dieter Jahn, Rebekka Biedendieck; Looking for natural competence in *Bacillus megaterium*; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie; Bremen, Deutschland (2013)

Tobias Knuuti, Sarah Wienecke, Patrick Heeger, Martin Gamer, Constanze Finger, Rebekka Biedendieck, Dieter Jahn; Looking for natural competence in *Bacillus megaterium*; 15th European Congress on Biotechnology; Istanbul, Türkei (2012)

Simon Stammen, Andreas Roth, Constanze Finger, Tobias Knuuti, Sarah Wienecke, Rebekka Biedendieck, Petra Dersch, Dieter Jahn; Production of recombinant glycosyltransferases using *Bacillus megaterium* and *Aspergillus niger*; Abschlusskolloquium des Sonderforschungsbereichs 578 „Vom Gen zum Produkt“; Braunschweig, Deutschland (2012)

Tobias Knuuti, Martin Gamer, Simon Stammen, David Fröde, Constanze Finger, Dieter Jahn, Rebekka Biedendieck; The role of ComK - First insights into development of natural competence in *Bacillus megaterium*?; 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics; Göttingen, Deutschland (2011)

„Zweifel ist der Weisheit Anfang“

- René Descartes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1. Horizontaler Gentransfer bei Bakterien.....	2
1.1.1. Transduktion.....	2
1.1.2. Konjugation.....	3
1.1.3. Natürliche Transformation.....	5
1.2. Natürliche Kompetenz	6
1.2.1. DNA-Aufnahme Apparat	7
1.2.2. Regulation der natürlichen Kompetenz	10
1.3. <i>Bacillus megaterium</i>	14
1.3.1. Natürliche Kompetenz in <i>Bacillus megaterium</i> und anderen Arten der Gattung <i>Bacillus</i>	16
1.3.2. Rekombinante Proteinproduktion mit <i>Bacillus megaterium</i>	19
1.4. Proteinsekretion in <i>Bacillus</i> spp.....	19
1.4.1. SEC-Pathway	20
1.4.2. Sekretion rekombinanter Proteine in <i>Bacillus megaterium</i> über den SEC-Pathway	23
1.5. Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Geräte und Chemikalien.....	26
2.1.1. Geräte und technische Anlagen.....	26
2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Materialien	27
2.2. Bakterienstämme und Plasmide	29
2.2.1. Bakterienstämme.....	29
2.2.2. Plasmide.....	30
2.2.3. Plasmidkonstruktion.....	32
2.3. Kulturmedien und Zusätze.....	36
2.3.1. Vollmedium für <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	36
2.3.2. Medienzusätze.....	36
2.4. Mikrobiologische Techniken	37
2.4.1. Sterilisation	37
2.4.2. Plattenkulturen von Bakterien	37
2.4.3. Flüssigkulturen von <i>Escherichia coli</i>	37

2.4.4. Flüssigkulturen von <i>Bacillus megaterium</i>	37
2.4.5. Bestimmung der Zelldichte	37
2.4.6. Lagerung von Bakterien	38
2.5. Molekularbiologische Methoden	38
2.5.1. Herstellung und Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	38
2.5.2. Herstellung und Transformation von <i>Bacillus megaterium</i> -Protoplasten	39
2.5.3. Zwei-Schritt Transformationsprotokoll zur natürlichen Transformation von <i>Bacillus megaterium</i>	42
2.5.4. Präparation genomischer DNA aus <i>Bacillus megaterium</i>	43
2.5.5. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	44
2.5.6. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Bacillus megaterium</i>	46
2.5.7. Präparation von RNA aus <i>Bacillus megaterium</i> für Microarray-Experimente	46
2.5.8. Prozessierung von RNA für Microarray	48
2.5.9. Scan von Microarrays	49
2.5.10. Auswertung von Microarrays	49
2.5.11. Site-Directed Mutagenesis (QuikChange)	50
2.5.12. DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.5.13. Reinigung von PCR-Amplifikaten	53
2.5.14. Bestimmung der DNA-Konzentration	53
2.5.15. Agarose-Gelelektrophorese	53
2.5.16. Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden	54
2.5.17. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	55
2.5.18. Reinigung von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten	55
2.5.19. Ligation von DNA	55
2.5.20. DNA-Sequenzierung	55
2.6. Proteinbiochemische Methoden	56
2.6.1. Expression rekombinanter Gene in <i>Bacillus megaterium</i>	56
2.6.2. Rekombinante Produktion von ComK _{Bmeg} in <i>Escherichia coli</i>	56
2.6.3. Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von MBP-ComK _{Bmeg}	58
2.6.4. Affinitätschromatographie zur Reinigung von GST-ComK _{Bmeg}	59
2.6.5. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test	60
2.6.6. Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.6.7. Western-Blot	62
2.6.8. Nicht-radioaktiver „Electrophoretic Mobility Shift Assay“	64
2.6.9. Bestimmung der Amylaseaktivität	66
2.6.10. Lumineszenzbestimmung	66

2.6.11. Fluoreszenzmikroskopie	67
3. Ergebnisse und Diskussion	68
3.1. Ausbildung natürlicher Kompetenz bei verschiedenen <i>Bacillus megaterium</i> Stämmen.....	69
3.2. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in <i>Bacillus megaterium</i> DSM-319	72
3.2.1. Etablierung der bakteriellen Luziferase als Reportersystem für <i>Bacillus megaterium</i>	72
3.2.2. Konstruktion von Reporterplasmiden zur Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene	77
3.2.3. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in <i>Bacillus megaterium</i> DSM-319	78
3.2.4. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in den <i>Bacillus megaterium</i> Stämmen DSM-319 und MS-941	86
3.3. Transkriptomanalyse von <i>Bacillus megaterium</i> MS-941 im Vergleich zu <i>Bacillus megaterium</i> DSM-319	92
3.4. Untersuchung des Proteins ComK aus <i>Bacillus megaterium</i>	100
3.4.1. Sequenzanalyse von ComK _{Bmeg} im Vergleich zu ComK _{Bsub}	100
3.4.2. Rekombinante Produktion von ComK _{Bmeg} in <i>Escherichia coli</i>	103
3.4.3. DNA-Bindestudien mit ComK _{Bmeg}	119
3.5. Untersuchungen zu Signalpeptiden des SEC-Pathways in <i>Bacillus megaterium</i>	123
3.5.1. Konstruktion eines plasmidbasierten Signalpeptid-Testsystems	123
3.5.2. Identifizierung der Signalpeptide des SEC-Pathways von <i>Bacillus megaterium</i> DSM-319	127
3.5.3. Untersuchungen zur Funktionalität und Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die Sekretion rekombinanter α -Amylase in <i>Bacillus megaterium</i>	130
3.5.4. Sequenzanalyse der getesteten Signalpeptide	136
4. Zusammenfassung	139
5. Ausblick	140
6. Literaturverzeichnis.....	141
7. Anhang	151
Danksagung	154

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (amino acid)
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APB	Alkalische Phosphatase Puffer (Buffer)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
Carb	Carbenicillin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA (double strand DNA)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (ethylenedinitrilotetraacetic acid)
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
g	Gramm
Gfp	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{deion}	Deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli
M	molar mol/l
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
min	Minute
M _r	relative Molekülmasse
n	Nano
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nt	Nukleotide
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
<i>orf</i>	offenes Leseraster (open reading frame)

<i>ori</i>	Replikationsursprung (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered Saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG 6000	Polyethylenglykol der mittleren M_r von 6000
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>rbs</i>	Ribosomenbindestelle (ribosome binding site)
rcf	„Relative centrifugal force“ (Relative Zentripetalbeschleunigung)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEC	Sekretion (Secretion)
SP	Signalpeptid
SRP	Signal recognition particle
ssDNA	einzelsträngige DNA (single strand DNA)
SV	Säulenvolumen
TAT	Twin-Arginine Transport
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenanteil pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (weight per volume)
x g	x Erdbeschleunigung
μ	Micro
RLU	relative Einheit für Lichtintensität (relative light units)

1. Einleitung

In der Umwelt lässt sich eine Vielzahl verschiedener Lebensformen mit zum Teil sehr unterschiedlichen Eigenschaften finden. Diese Diversität ermöglicht es den Organismen unter den verschiedensten Umweltbedingungen zu überleben, was dazu führt, dass an nahezu jedem Ort Leben zu finden ist. Bei der Besiedelung der verschiedenen ökologischen Nischen erweisen sich unter anderem die Bakterien als sehr erfolgreich. Die Grundlage für die Besiedlung unterschiedlicher Lebensräume ist die evolutionäre Anpassung an die jeweils vorherrschenden Bedingungen. Klassischer Weise wird hierbei in erster Linie an die Evolution in vertikaler Richtung gedacht, also die Weitergabe von genetischer Information in Form von DNA von einer parentalen Generation an die Tochtergeneration (Fuchs, 2014). Dabei kann es zu Mutationen oder Neu-Kombinationen der DNA kommen, die letztlich zu einer verbesserten Anpassung der Tochtergenerationen an die Umweltbedingungen führen können. Darüber hinaus gibt es jedoch gerade im Reich der Bakterien einen Austausch von genetischer Information in horizontaler Richtung, also zwischen zwei Zellen, die ursprünglich nicht auseinander hervorgegangen sind (Abb. 1.1). Dieser Vorgang des horizontalen (oder: lateralen) Gentransfers ermöglicht unter anderem den Austausch zwischen miteinander nur äußerst entfernt verwandten Arten. Dabei kann genetische Information sogar über die Grenzen der verschiedenen Domänen des Lebens hinaus, zwischen Archaeen, Eukaryoten und Bakterien, ausgetauscht werden (Aravind *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999). Bei einer Untersuchung von 88 verschiedenen Bakterienarten wurde festgestellt, dass je nach Art bis zu 22% aller im Genom enthaltenen Gene durch horizontalen Gentransfer eingebracht wurden (Garcia-Vallve *et al.*, 2003). Somit handelt es sich beim horizontalen Gentransfer um einen wichtigen Mechanismus zur Verbreitung verschiedener Fähigkeiten und Eigenschaften, wie z.B. Resistenzen gegen Antibiotika, Virulenzgenen oder alternativen Stoffwechselwegen (Jain *et al.*, 2003; Koonin und Wolf, 2008; Croucher *et al.*, 2011; Popa und Dagan, 2011).

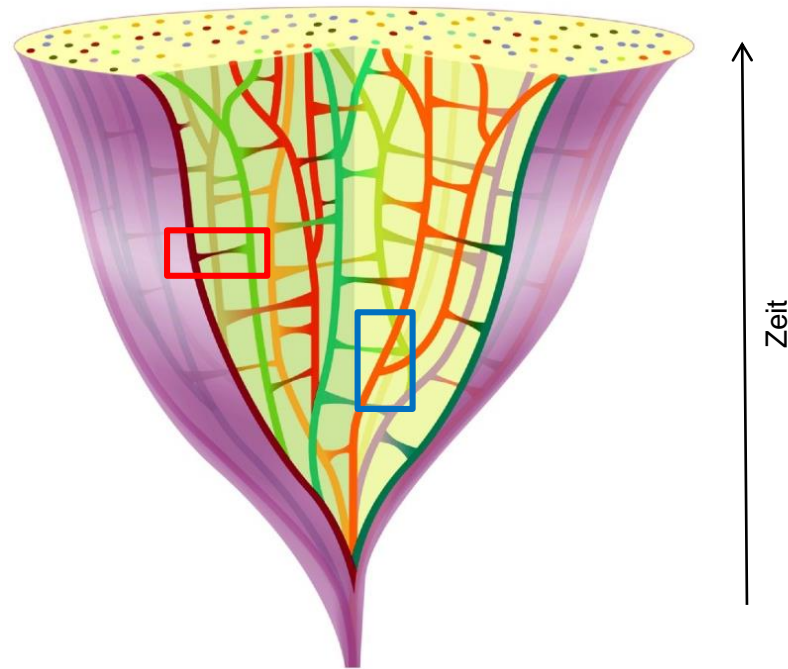


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener bakterieller Genome (Schematische Darstellung). Vertikale Linien und Abzweigungen (blauer Kasten) zeigen die evolutionäre Entwicklung in vertikaler Richtung, von Eltern- zu Tochtergeneration. Horizontale Verbindungen (roter Kasten) stellen Ereignisse des horizontalen Gentransfers dar. Verschiedene Linienfarben stellen unterschiedliche Verwandtschaftsgrade dar (Popa und Dagan, 2011).

1.1. Horizontaler Gentransfer bei Bakterien

Beim horizontalen Gentransfer bei Bakterien kann grundsätzlich zwischen den drei Mechanismen Transduktion, Konjugation und natürliche Transformation unterschieden werden (Abb. 1.2) (Popa und Dagan, 2011).

1.1.1. Transduktion

Bei der Transduktion erfolgt der Gentransfer über Bakteriophagen. Im Rahmen einer Infektion eines Bakteriums durch Bakteriophagen wird ein DNA-Fragment aus dem Genom der Zelle in Phagen verpackt. Nach der Lyse der Zelle gelangt das DNA-Fragment über eine erneute Phageninfektion in eine neue Bakterienzelle und wird dort in das Wirtsgenom integriert. Bei der Transduktion kann zwischen den zwei Mechanismen „allgemeine Transduktion“ und „spezielle Transduktion“ unterschieden werden (Slonczewski und Foster, 2012; Fuchs, 2014).

Bei der allgemeinen Transduktion kann prinzipiell jedes beliebige DNA-Fragment des Wirtsgenoms in einen Phagen verpackt werden. Dieses wird dadurch ermöglicht, dass im Zuge des Zusammenbaus neuer Phagen innerhalb der Bakterienzelle nicht zwischen

Phagen- und bakterieller DNA unterschieden werden kann. Daher wird ein Teil der neu produzierten Phagen mit bakterieller statt mit Phagen-DNA beladen. Diese Phagen können dann analog zu den mit Phagen-DNA beladenen Phagen eine neue Wirtszelle infizieren. Die enthaltene bakterielle DNA kann dann über homologe Rekombination in dessen Genom integrieren. Statistisch gesehen wird bei einer ausreichend hohen Anzahl an produzierten Phagen jedes Gen des Wirtsgenoms in einen Phagen verpackt und in eine neue Zelle transferiert.

Im Gegensatz zur allgemeinen Transduktion kann bei der speziellen Transduktion nur eine limitierte Anzahl an verschiedenen Wirtsgenen übertragen werden. Bei diesem Mechanismus wird die vom Phagen eingebrachte DNA zunächst an einer spezifischen Stelle in das Wirtsgenom integriert. Dieses integrierte Phagengenom kann auf unbestimmte Zeit in dem Wirtsgenom verbleiben und wird als Prophage bezeichnet. Als Reaktion auf bestimmte Signale, wie beispielweise DNA-Schädigungen, erfolgt die Reaktivierung des Prophagen. Dabei wird das Phagengenom wieder ausgeschnitten, repliziert und die auf ihm enthaltenen Gene exprimiert. Dieses führt letztlich zur Produktion neuer Phagen, die mit dem Phagengenom beladen sind. Im Normalfall wird ausschließlich das Phagengenom aus dem Wirtsgenom ausgeschnitten. In einigen Fällen erfolgt diese Exzision jedoch nicht absolut präzise, so dass benachbarte DNA Abschnitte aus dem Wirtsgenom mit ausgeschnitten werden. Diese werden in der Folge mit repliziert und in die neu produzierten Phagen verpackt. Somit können also auch hier gewisse Gene des Wirtsgenoms in neue Bakterienzellen transferiert und in das Genom des neuen Wirts integriert werden. Dieser Vorgang führt letztlich wieder zu einer genetisch modifizierten, also transformierten, Zelle.

Da Phagen im Allgemeinen eine hohe Wirtsspezifität aufweisen, kann genetische Information durch Transduktion nur zwischen Arten ausgetauscht werden, die jeweils von dem gleichen Phagen infiziert werden können. Diese Eigenschaft begrenzt die Anwendbarkeit der Methode in der Laborpraxis sowie ihre Rolle als Instrument des horizontalen Gentransfers in der Umwelt.

1.1.2. Konjugation

Bei der Konjugation erfolgt der Transfer von DNA von einem Bakterium zu einem anderen durch direkten Kontakt zwischen den beiden Zellen (Norman *et al.*, 2009; Wozniak und Waldor, 2010; Arutyunov und Frost, 2013). Dieser Kontakt wird über den so genannten Pilus herbeigeführt. Dabei handelt es sich um eine längliche, aus der Zelle herausragende Struktur, die von der Donor-Zelle gebildet wird. Die Rezipienten-Zelle adhärirt an diesen Pilus und wird durch dessen Degradation in unmittelbaren Kontakt mit der Donor-Zelle gebracht. Dabei entsteht eine Verbindung zwischen dem Cytoplasma der beiden Zellen. Über diese so genannte Konjugationsbrücke erfolgt dann die Übertragung der DNA.

Voraussetzung für die Konjugation ist die Fähigkeit zur Bildung eines Pilus. Die hierfür notwendige genetische Ausstattung ist entweder chromosomal oder auf einem Plasmid codiert und liegt nicht in allen Bakterien vor. Daher kann der Austausch genetischer Informationen im Falle der Konjugation auch nur von gewissen Arten aus stattfinden, welche über diese Fähigkeit verfügen. Zusätzlich müssen die Zellen in räumlicher Nähe zueinander vorliegen, um miteinander in Kontakt kommen zu können. Daher kann Konjugation nur zwischen Arten stattfinden, die in demselben Lebensraum vorkommen.

Der Mechanismus der Konjugation wird unter anderem für gentechnische Arbeiten genutzt. So wird beispielsweise der *Escherichia coli* Stamm S17-1 λ pir eingesetzt, um gezielt gewünschte DNA-Fragmente in andere Bakterienarten zu übertragen. Jedoch ist hierbei sowohl die Transformationseffizienz als auch das Spektrum an Rezipienten-Arten begrenzt. Hierfür ist unter anderem das Phänomen der „surface-/entry-exclusion“ verantwortlich, dass zur Inkompatibilität mancher Arten hinsichtlich der Konjugation führt (Norman *et al.*, 2009; Arutyunov und Frost, 2013).

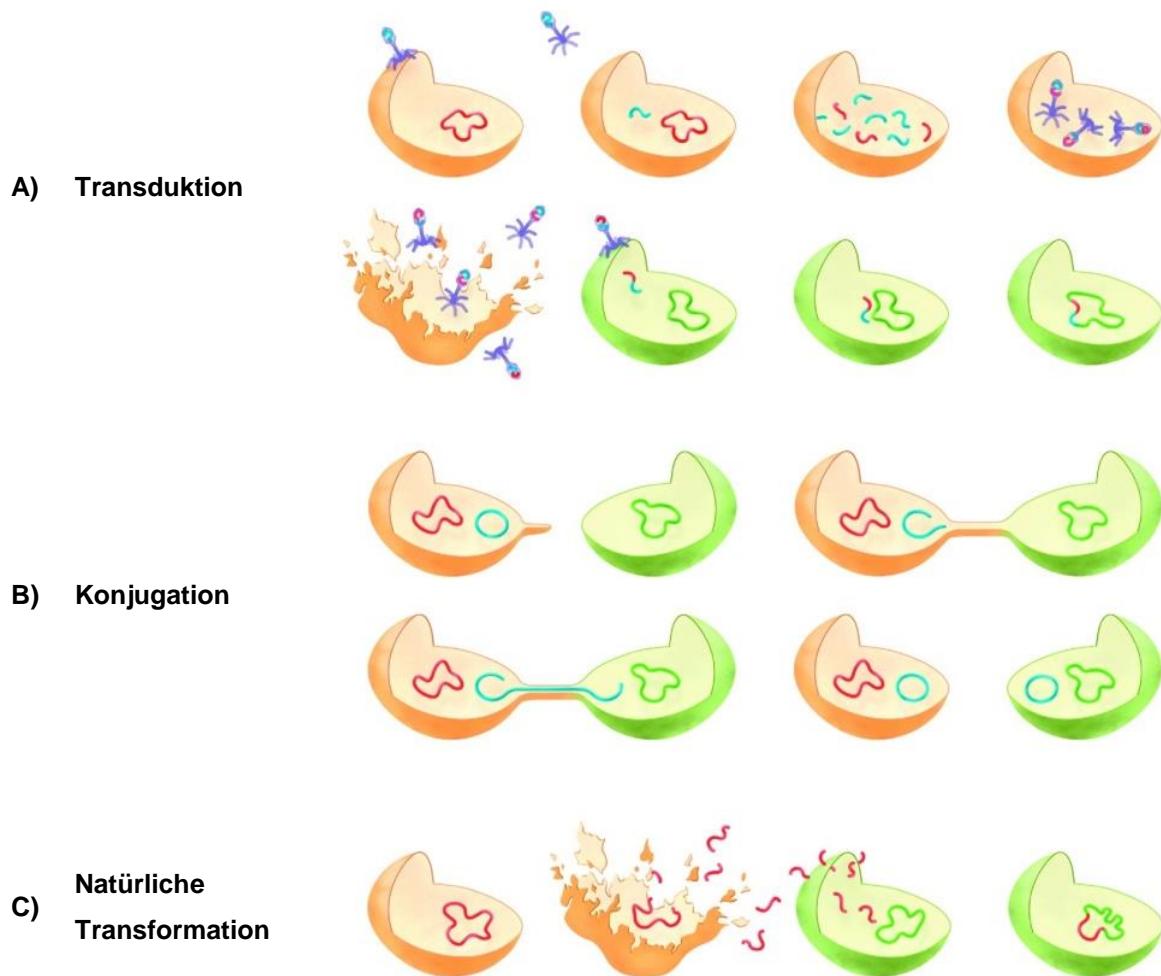


Abbildung 1.2: Übersicht über die verschiedenen Mechanismen des horizontalen Gentransfers bei Bakterien. **A) Transduktion.** Bakteriophagen binden spezifisch an eine Bakterienzelle und injizieren ihr Phagengenom in die Zelle. Bei der Produktion neuer Phagen werden diese mit DNA beladen. Dabei kann bakterielle DNA statt Phagen-DNA eingepackt werden. Nach der Lyse der Wirtszelle binden die neu produzierten Phagen an neue Bakterienzellen. Durch die Injektion ihrer DNA übertragen sie die zuvor aufgenommene bakterielle DNA in den neuen Wirt. **B) Konjugation.** Eine Bakterienzelle (Donor-Zelle) bildet einen Pilus aus. Dieser bindet an eine Rezipienten-Zelle. Durch Retraktion des Pilus kommen die Zellen in räumliche Nähe, so dass eine Verbindung zwischen deren Cytoplasma hergestellt wird (Konjugationsbrücke). Über die Konjugationsbrücke findet der Transfer von DNA von der Donor- zur Rezipienten-Zelle statt. **C) Natürliche Transformation.** DNA wird beispielsweise durch die Lyse einer Zelle in die Umgebung freigesetzt. Die freie DNA wird von einer natürlich kompetenten Zelle aktiv aufgenommen (Popa und Dagan, 2011).

1.1.3. Natürliche Transformation

Ein weiterer Mechanismus des horizontalen Gentransfers bei Bakterien ist die natürliche Transformation. Hierbei handelt es sich um die aktive Aufnahme von frei in der Umgebung vorkommender DNA und deren Integration ins Genom der Zelle oder die Erhaltung als frei replizierendes Plasmid. Während „natürliche Transformation“ den Prozess der Aufnahme

und Integration der DNA an sich beschreibt, bezeichnet der Begriff „natürliche Kompetenz“ die grundsätzliche Fähigkeit einer Zelle zu diesem Vorgang. Somit stellt „natürliche Kompetenz“ die Fähigkeit zur „natürlichen Transformation“ dar.

1.2. Natürliche Kompetenz

Die ersten Beobachtungen zur natürlichen Kompetenz wurden bereits 1928 von Griffith bei seinen Arbeiten mit *Streptococcus pneumoniae* gemacht (Griffith, 1928). Im Jahre 1944 konnten Avery und Kollegen wiederum bei Untersuchungen von *S. pneumoniae* erstmals sowohl DNA als Träger der genetischen Information identifizieren als auch zeigen, dass frei in der Umgebung vorliegende DNA ausreichend ist, um Zellen zu transformieren, und somit weitere Hinweise auf natürliche Kompetenz liefern (Avery *et al.*, 1944). Auch bei *Bacillus subtilis* konnte Spizizen 1958 ähnliche Vorgänge beobachten (Spizizen, 1958). In der Folge waren *S. pneumoniae* und *B. subtilis* Gegenstand weiterer Arbeiten zu diesem Thema und wurden so zu den Modellorganismen für dieses Phänomen. Im Laufe der Zeit konnte natürliche Kompetenz bei vielen weiteren Arten, wie z.B. *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae* oder *Staphylococcus aureus*, beobachtet werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt (Ende 2014) konnte diese Eigenschaft bei ~80 Bakterienarten nachgewiesen werden, wobei Vertreter aus allen Taxa zu finden sind (Johnsborg *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 2014). Es kann davon ausgegangen werden, dass es noch eine Vielzahl weiterer natürlich kompetenter Arten gibt, für welche diese Eigenschaft bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte. Unabhängig vom Grad der phylogenetischen Verwandtschaft konnte bei den bisher untersuchten Arten jedoch interessanter Weise ein weitgehend konservierter Mechanismus zur Aufnahme der DNA identifiziert werden, der sich auch bei Gram-positiven und -negativen Arten stark ähnelt.

Bezüglich der eigentlichen Funktion(en) der Aufnahme von DNA in eine Zelle werden drei unterschiedliche Hypothesen diskutiert (Dubnau, 1999; Johnsborg *et al.*, 2007). Dabei geht die erste Hypothese davon aus, dass die aufgenommene DNA in ihre Bausteine zerlegt wird und als Nährstoffquelle dient („DNA for food“). Die zweite Theorie besagt, dass die „neue“ DNA zur Reparatur von DNA-Schäden im Genom des natürlich kompetenten Bakteriums verwendet wird („DNA for repair“). Als dritte Hypothese gilt schließlich, dass durch die Aufnahme von DNA aus der Umgebung neue genetische Informationen und somit nützliche, neue oder verbesserte Eigenschaften erhalten werden („DNA for genetic diversity“). Für jede dieser Hypothesen gibt es theoretische und experimentelle Argumente die sowohl für, als auch gegen die jeweilige Theorie sprechen (Redfield, 1993; Johnston *et al.*, 2014). Daher bleibt vorerst unklar, welche dieser Funktionen ursprünglich zu der Entwicklung der natürlichen Kompetenz geführt hat. Jedoch ist naheliegend, dass nicht eine einzelne,

sondern die Kombination aller drei Funktionen zu einem evolutionären Vorteil und somit zu der Entstehung der natürlichen Kompetenz beigetragen hat.

Im Gegensatz zu den Prozessen der Transduktion und Konjugation spielt der Ursprung der aufgenommenen DNA im Falle der natürlichen Kompetenz keine Rolle. Daher kann grundsätzlich auch DNA aufgenommen werden, die aus Eukaryoten oder Archaeen stammt. Eine Ausnahme hiervon sind Bakterienarten aus den Familien der Pasteurellaceae und Neisseriaceae, welche je eine Präferenz für die DNA nah verwandter Arten aufweisen (Smith *et al.*, 1999; Duffin und Seifert, 2010). Für Bakterien aus anderen Familien bedeutet dies jedoch, dass ein enorm großes Reservoir an neuen Eigenschaften zur Verfügung steht. Angesichts dieser Tatsache stellt die natürliche Kompetenz einen sehr wichtigen Mechanismus des horizontalen Gentransfers dar. Sie trägt maßgeblich zur Verbreitung neuer Eigenschaften, wie z.B. Antibiotikaresistenzen, bei und ist ein wichtiger Faktor bei der Evolution von Bakterien. Darüber hinaus ist die natürliche Kompetenz sowohl für die grundlegende Erforschung von Bakterien als auch für die gezielte Optimierung biotechnologisch relevanter Arten von großem Interesse, da sie eine vergleichsweise simple und effektive genetische Manipulation ermöglicht.

1.2.1. DNA-Aufnahme Apparat

Für die Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung in die Zelle und ihrer Integration ins Genom bzw. ihrem Erhalt als frei replizierendes Plasmid ist eine Vielzahl verschiedener Proteine verantwortlich (Abb. 1.3). Grundsätzlich kann dieser Prozess dabei in 3 Schritte unterteilt werden: 1) Bindung der extrazellulären DNA an die Zelle, 2) Transport der DNA in die Zelle, 3) Integration der DNA ins Genom oder Erhalt als Plasmid.

Angesichts der Ähnlichkeit zwischen den DNA-Aufnahmesystemen der verschiedenen natürlich kompetenten Arten werden im Folgenden die einzelnen Schritte dieses Prozesses am Beispiel des am besten untersuchten Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* beschrieben.

1.2.1.1. Bindung der DNA an die Zelle

Zur Aufnahme extrazellulärer DNA in die Zelle muss die freie DNA an das Zellmembran-assoziierte Protein ComEA binden (Takeno *et al.*, 2012). Bei Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* muss die DNA hierfür zunächst die Peptidoglycanschicht der Zellwand überwinden. Essentiell hierfür scheint ein aus der Zellwand herausragender, Membran-verankerter Multiproteinkomplex zu sein, der sogenannte Pseudopilus, der eine Länge von 40 - 100 nm hat. Die an dieser Struktur beteiligten Proteine zeigen Homologien zu den Komponenten der Typ 4 Pili und des Typ 2 Sekretionssystems. Bei *B. subtilis* besteht dieser

Pseudopilus aus den ComG Proteinen, die in einem 7 Gen-Operon (*comGA* bis *comGG*) codiert sind. Diese Proteine bilden einen multimeren Heteroproteinkomplex, wobei ComGC mit 40 - 100 Monomeren den Hauptbestandteil darstellt (Dubnau, 1997; Chen *et al.*, 2006). Auf welche Weise der Pseudopilus der DNA ermöglicht mit dem Membran-assoziierten ComEA in Kontakt zu kommen ist derzeit noch nicht bekannt. Es wird jedoch spekuliert, dass die extrazelluläre DNA zunächst an den Pseudopilus bindet, dieser dann durch Degradation verkürzt wird und so die DNA an die Zellmembran führt (Burrows, 2005; Claverys *et al.*, 2009). Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass der Pseudopilus einen Kanal in der Zellwand erzeugt, durch welchen die DNA an die Zellmembran gelangen kann. In beiden Fällen bindet die DNA dort dann an das Protein ComEA und kann weiter in das Cytoplasma transportiert werden (Provvedi und Dubnau, 1999; Takeno *et al.*, 2012).

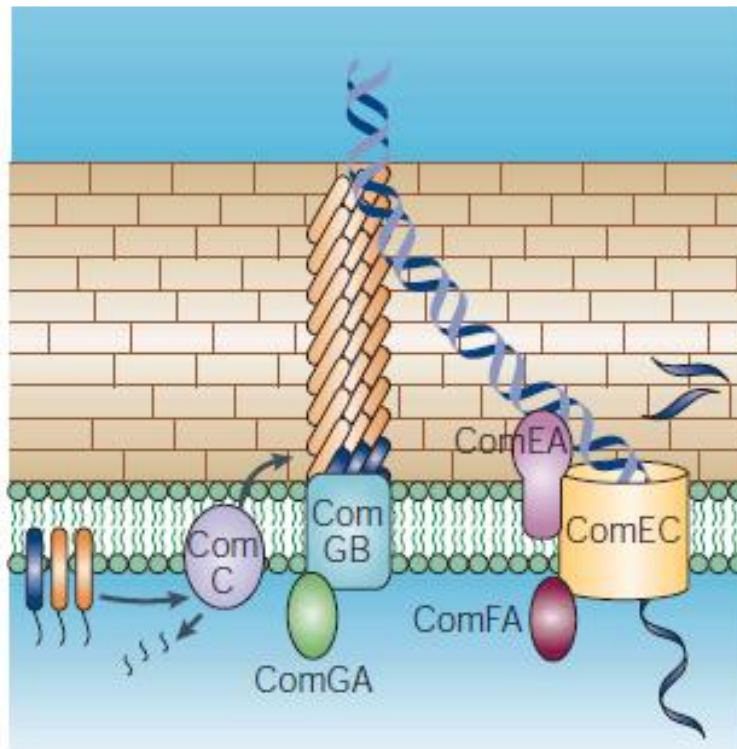


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des DNA-Aufnahme Apparats in *B. subtilis*. Das Haupt-Pilin ComGC (orange) und die Neben-Piline ComGD, ComGE und ComGG (dunkelblau) werden von der Präpilin Peptidase ComC (lila) prozessiert und bilden den Pseudopilus aus. Das Membranprotein ComGB (hellblau) und die NTPase ComGA (grün) sind an diesem Prozess beteiligt. Extrazelluläre dsDNA bindet an den Pseudopilus und gelangt zum Membran-gebundenen DNA-Rezeptor ComEA (pink). Die gebundene DNA wird als Einzelstrang (ssDNA) durch die ComEC-Pore (gelb) in das Cytoplasma transportiert. An diesem Transport ist die ATP-abhängige Helikase ComFA (rot) beteiligt (Chen und Dubnau, 2004).

1.2.1.2. Transport der DNA in die Zelle

Der eigentliche Transport der DNA über die Zellmembran in das Cytoplasma erfolgt durch eine Pore, die aus dem Protein ComEC besteht. Dabei wird bei allen bisher untersuchten Bakterienarten die DNA als Einzelstrang (ssDNA) in die Zelle transportiert (Draskovic und Dubnau, 2005). Da die extrazelluläre DNA jedoch in der Regel als doppelsträngige DNA (dsDNA) vorliegt und auch so an die Zelle bindet, muss einer der beiden Stränge zunächst degradiert werden. Für *S. pneumoniae* konnte diese Funktion der Membran-assoziierten Endonuklease EndA zugeordnet werden (Bergé *et al.*, 2013), wohingegen in *B. subtilis* das verantwortliche Protein bisher noch nicht identifiziert werden konnte (Chen und Dubnau, 2004). Nach der Degradation des einen Strangs werden die entstandenen Nukleotide in die Umgebung freigesetzt. Der verbleibende Strang wird mit Hilfe des Proteins ComFA durch die ComEC-Pore aktiv in das Cytoplasma gebracht. Bei ComFA handelt es sich um eine ATP-abhängige Helikase, die an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Es wird davon ausgegangen, dass sie als Motorprotein unter ATP Verbrauch für den aktiven Transport der ssDNA durch die Pore zuständig ist (Londoño-Vallejo und Dubnau, 1994).

Angesichts der Vielzahl der verschiedenen an der DNA Bindung und Transport beteiligten Proteine wird deutlich, dass diese Proteine in räumlicher Nähe zueinander in einem Multiproteinkomplex lokalisiert sein müssen, um das Funktionieren des gesamten Apparates zu gewährleisten. Nur so kann die extrazelluläre DNA in die Zelle aufgenommen und im weiteren Verlauf in Form von ssDNA als neue genetische Information genutzt werden.

1.2.1.3. Integration der DNA ins Genom

Freie ssDNA wird im Cytoplasma einer Bakterienzelle in der Regel sehr schnell von Nukleasen abgebaut, was unter anderem einen Schutzmechanismus vor potentiell schädlicher Fremd-DNA aus Bakteriophagen darstellt. Daher ist es essentiell, dass die im Rahmen der natürlichen Kompetenz aufgenommene ssDNA unmittelbar nach dem Transport ins Cytoplasma vor der Degradation durch zelleigene Nukleasen geschützt wird. Dies geschieht durch die Anlagerung von speziellen Proteinen an die ssDNA, die somit eine schützende Hülle bilden und den Zugang für die Nukleasen verhindern. In der Folge kann die ssDNA dann mittels homologer Rekombination in das Genom der Zelle integriert werden. Hinsichtlich der am Schutz und der Rekombination beteiligten Proteine konnten in *B. subtilis* bisher die fünf Proteine SsbB, DprA, RecA, RadA und CoiA identifiziert werden (Claverys *et al.*, 2009). Bei der genauen Funktion und den Mechanismen der jeweiligen Proteine besteht derzeit noch Unklarheit. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RecA essentiell für die Integration der aufgenommenen DNA in das Genom mittels homologer Rekombination ist (Dubnau *et al.*, 1973; Claverys *et al.*, 2009).

Die hier für *B. subtilis* beschriebenen Mechanismen zur Aufnahme und Integration der extrazellulären DNA lassen sich mit hoher Ähnlichkeit bei den verschiedenen natürlich kompetenten Bakterienarten finden. Dieses gilt unabhängig von der teilweise weit entfernten phylogenetischen Verwandtschaft einiger Arten, woraus sich die Frage nach den evolutionären Ursprüngen der natürlichen Kompetenz ergibt. Eine Möglichkeit wäre hierbei, dass sich diese Eigenschaft in verschiedenen Bakterienarten mehrfach unabhängig voneinander entwickelt hat. Jedoch ist es äußerst unwahrscheinlich, dass dabei zufällig jeweils derart ähnliche Systeme entstanden wären (Johnston *et al.*, 2014). Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass die natürliche Kompetenz bereits sehr früh in einem gemeinsamen Vorgänger der heutigen Bakterienarten entstanden ist und dann im Laufe der Evolution weitgehend konserviert in den verschiedenen Arten erhalten blieb. Da langfristig im Rahmen der Evolution nur Eigenschaften erhalten bleiben, die einen Selektionsvorteil bieten, scheint die natürliche Kompetenz also einen eben solchen Selektionsvorteil für Bakterien darzustellen. Dieses verdeutlicht weiterhin die wichtige Rolle der natürlichen Kompetenz (Johnston *et al.*, 2014).

1.2.2. Regulation der natürlichen Kompetenz

Die natürliche Kompetenz erfordert die Synthese einer Vielzahl verschiedener Proteine und ist daher mit hohen energetischen Kosten für die Zelle verbunden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass DNA mit schädlichen genetischen Informationen von einer Zelle aufgenommen wird. Insgesamt erscheint es daher sinnvoll, dass natürliche Kompetenz in den meisten Arten strikt reguliert ist und nur unter bestimmten Bedingungen ausgebildet wird. Ausgenommen hiervon sind die konstitutiv natürlich kompetenten Arten *Neisseria gonorrhoeae* und *N. meningitidis*, die an dieser Stelle jedoch nicht weiter berücksichtigt werden (Sparling, 1966).

Im Gegensatz zu dem Prozess der DNA-Aufnahme lassen sich bei den regulatorischen Mechanismen, die der natürlichen Kompetenz zu Grunde liegen, deutliche Unterschiede zwischen den Arten beobachten. Im Folgenden werden daher grundlegende Prinzipien beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt dann am Beispiel des Modellorganismus *B. subtilis* (Abb.1.4).

1.2.2.1. Einfluss von Zelldichte

Eine grundlegende Bedingung für die erfolgreiche Aufnahme und weitere Nutzung von DNA ist das Vorhandensein von freier extrazellulärer DNA. Es konnte jedoch bisher bei keiner Art beobachtet werden, dass DNA selbst als Signal fungiert und so zur Induktion der natürlichen Kompetenz führt (Mell und Redfield, 2014). Dennoch haben die verschiedenen Arten

Mechanismen entwickelt, um natürliche Kompetenz unter Bedingungen auszubilden, unter denen das Vorliegen von extrazellulärer DNA sehr wahrscheinlich ist. So ist oftmals ein Quorum-sensing System an der Regulation beteiligt, mit Hilfe dessen die Bakterien unter anderem die Zelldichte der Population wahrnehmen können. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass ausreichend Zellen in der Umgebung vorhanden sind, die als Quelle von Fremd-DNA in Frage kommen.

Bei *B. subtilis* erfolgt dieses Quorum-sensing zum Teil über das ComQXPA-System. Dabei fungiert das 6,5 kDa Protein ComX als extrazelluläres Pheromon. Dieses wird von dem Protein ComQ zunächst prozessiert und dann aus der Zelle in die Umgebung transportiert. Somit stellt die Menge an ComX das eigentliche Signal bezüglich der vorherrschenden Zelldichte dar. Die Wahrnehmung des Signals erfolgt über das Zwei-Komponenten-System ComPA. Hierbei ist das Protein ComP die Membran-ständige Histidinkinase, an die ComX bindet. Als Folge dieser Bindung wird ComA durch ComP phosphoryliert und wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene (Dogsä *et al.*, 2014). Für die natürliche Kompetenz in *B. subtilis* ist hierbei das Gen *comS* von Relevanz, dessen Expression von ComA aktiviert wird. Durch das so gebildete Protein ComS wird ein weiteres Protein, ComK, vor dem proteolytischen Abbau durch einen MecA/ClpCP-Protease-Komplex geschützt (Turgay *et al.*, 1998). Letztlich führt also die Signalkaskade, die durch die Anwesenheit von ComX ausgelöst wird, zu einer Akkumulation des Proteins ComK. Bei ComK handelt es sich um den zentralen Regulator der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis*. Es konnte gezeigt werden, dass ComK die Expression von >100 Genen beeinflusst (Berka *et al.*, 2002). Zu diesen Genen gehören unter anderem die so genannten „späten Kompetenzgene“, deren Expression durch ComK aktiviert wird. Diese späten Kompetenzgene wiederum codieren für die Proteine, die in der Folge für den Prozess der DNA-Aufnahme und -Prozessierung verantwortlich sind. Hierzu zählen beispielsweise die zuvor beschriebenen Proteine ComGC oder ComEC.

1.2.2.2. Einfluss von Stress

Ein weiterer Faktor, der oftmals Einfluss auf die Induktion der natürlichen Kompetenz hat, ist Stress (Claverys *et al.*, 2006). Hierbei kann es sich z.B. um Nährstoffmangel, Beschädigungen der genomischen DNA oder eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine durch fehlerhafte Proteinbiosynthese, beispielsweise durch Antibiotika induziert, handeln (Jarmer *et al.*, 2002; Prudhomme *et al.*, 2006; Zeigler *et al.*, 2008; Nijland *et al.*, 2010). Bei manchen *B. subtilis* Stämmen tritt natürliche Kompetenz unter Laborbedingungen beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase auf. Dabei kann von einer durch Nährstofflimitierung bedingten Stresssituation ausgegangen werden. Auf molekularer Ebene erfolgt die Regulation dabei wieder über den Regulator ComK. Dessen Aktivität wird neben

dem zuvor beschriebenen Quorum-sensing System auch über andere regulatorische Mechanismen gesteuert, welche abhängig von der Wachstumsphase und dem Nährstoffangebot sind. Unter anderem ist das komplexe Spo0A Phosphorelay-System beteiligt (Mirouze *et al.*, 2012), das die Aktivität des Proteins AbrB beeinflusst (Hahn und Roggiani, 1995). Bei AbrB handelt es sich um einen globalen Regulator der Übergangsphase von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase (Chumsakul *et al.*, 2011). Er reprimiert, neben einer Vielzahl anderer Gene, die Expression von *comK* während der exponentiellen Wachstumsphase (Hamoen *et al.*, 2003). Beim Übergang in die stationäre Phase wird AbrB selbst nicht mehr produziert und kann somit nicht mehr reprimierend auf die Expression von *comK* wirken. Weiterhin sind an der Regulation der *comK* Expression die Proteine Rok (Hoa *et al.*, 2002; Albano *et al.*, 2005), CodY (Serror und Sonenshein, 1996), DegU (Hamoen *et al.*, 2000) und ComK selbst (Smits *et al.*, 2005) beteiligt, wobei es Hinweise darauf gibt, dass eine Reihe weiterer bisher nicht genauer untersuchter Faktoren eine Rolle spielen (Hamoen, 2003). Insgesamt ergibt sich somit ein überaus komplexes regulatorisches Netzwerk mit einer Vielzahl von Komponenten und Wechselwirkungen.

1.2.2.3. Co-Regulation anderer Prozesse

Zusätzlich zu der natürlichen Kompetenz haben die hier erwähnten regulatorischen Mechanismen Einfluss auf viele andere zelluläre Prozesse. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um „Stressantworten“ wie beispielsweise Sporulation, Motilität oder die Produktion von Antibiotika (Grossman, 1995; Claverys *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2009; Shank und Kolter, 2011). Vor diesem Hintergrund sollte natürliche Kompetenz daher auch nicht als isolierter Mechanismus, sondern vielmehr im Kontext der anderen Prozesse betrachtet werden. Es handelt sich um eine mögliche Option eines „Entscheidungsfindungsprozesses“ zur Steigerung der Überlebenswahrscheinlichkeit einer Population. In Übereinstimmung damit lässt sich bei *B. subtilis* beobachten, dass unter entsprechenden Bedingungen jeweils nur ca. 10% einer Population natürlich kompetent werden, während die übrigen Zellen ein anderes Verhalten, wie beispielsweise Sporulation oder Motilität, zeigen (Haijema *et al.*, 2001).

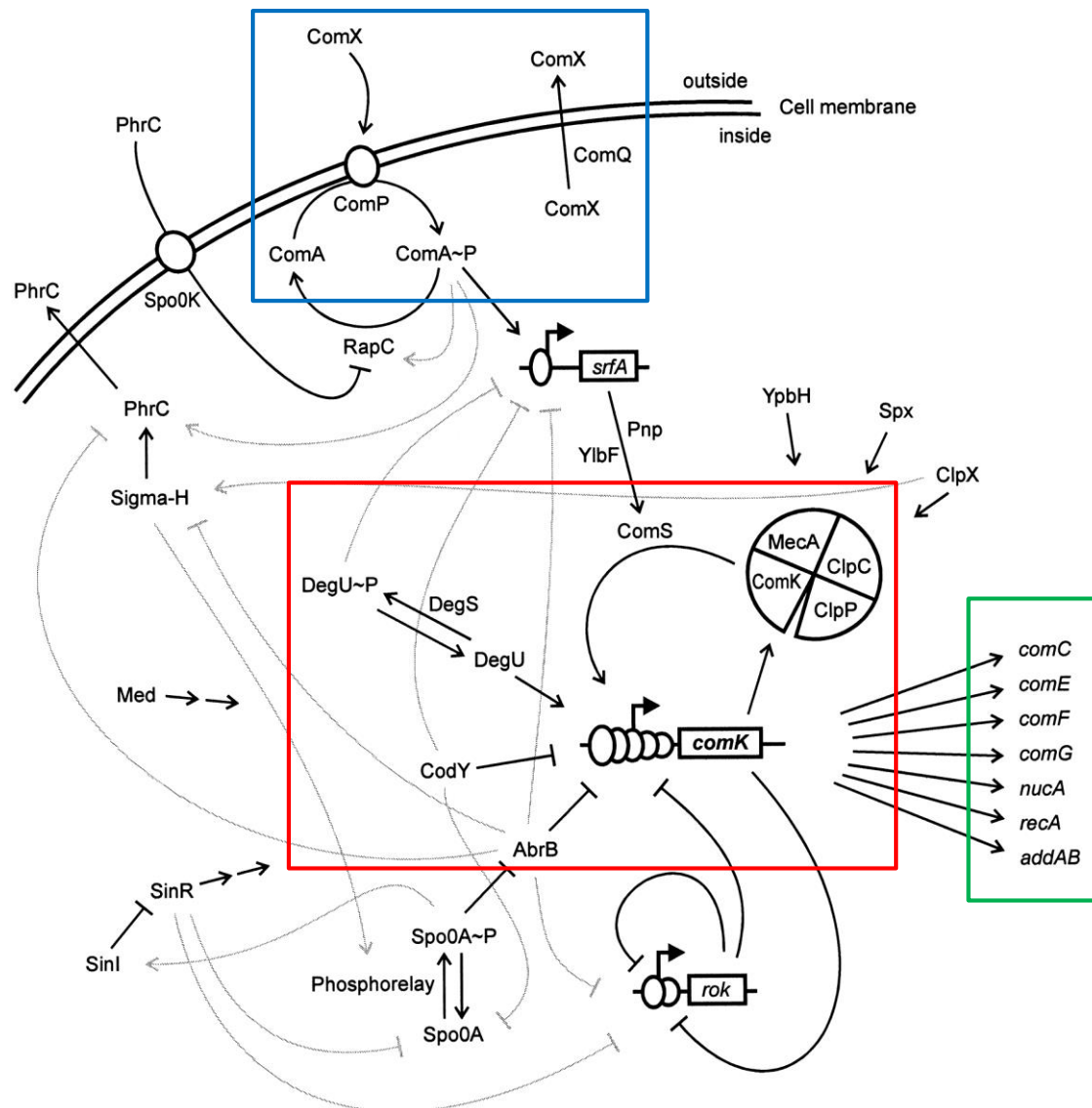


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerkes der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 1.2.2). Die primären regulatorischen Mechanismen sind durch schwarze Striche gekennzeichnet, graue Striche stellen weitere regulatorische Mechanismen dar. Pfeile: aktivierende Wirkung, T-Striche: reprimierende Wirkung. Dargestellt sind sowohl die Quorum-sensing Komponenten der Regulation (oberer Teil der Abbildung) mit dem zentralen ComQXPA-System (blauer Kasten) sowie die unmittelbare Regulation von ComK, des zentralen Regulators der natürlichen Kompetenz (roter Kasten). Dabei ist die Regulation auf transkriptioneller Ebene (durch ComK, DegU, CodY, AbrB, Rok) und die Regulation des Proteins ComK durch den proteolytischen MecA/ClpCP-Komplex dargestellt. Die Akkumulation von ComK führt schließlich zur Expression der späten Kompetenzgene (grüner Kasten) (Hamoen, 2003).

1.2.2.4. Unterschiede in der Regulation

Zwischen den verschiedenen Bakterienarten gibt es teilweise große Unterschiede bei den regulatorischen Mechanismen der natürlichen Kompetenz. Diese Unterschiede treten dabei zum Teil sogar zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art auf. So lässt sich beispielsweise der domestizierte Laborstamm *B. subtilis* 168 unter definierten Bedingungen

mit einer relativ hohen Effizienz mittels natürlicher Kompetenz transformieren. Dahingegen sind Umweltisolate von *B. subtilis* oder *B. subtilis* NCIB 3610, der Parentalstamm von *B. subtilis* 168, unter den selben Bedingungen nur äußerst ineffizient transformierbar (Zeigler *et al.*, 2008; Nijland *et al.*, 2010).

Angesichts dessen wird deutlich, dass nur in gewissem Maße von der bekannten Regulation einer Art auf die Regulation in einer anderen Art geschlossen werden kann. Vielmehr können die bekannten regulatorischen Mechanismen nur als Anhaltspunkt genutzt werden. Für jede neue Art ist somit eine individuelle Untersuchung der natürlichen Kompetenz und der Bedingungen unter der sie ausgebildet wird erforderlich.

Nichtsdestotrotz stellt die natürliche Kompetenz eine äußerst attraktive Methode zur genetischen Manipulation von Bakterien dar. Dies gilt insbesondere für Organismen, die sich sonst nicht oder nur schwierig transformieren lassen und beispielsweise für biotechnologische Anwendungen interessant sind. Eine der Bakterienarten, für welche diese Punkte zutreffen, ist *Bacillus megaterium*.

1.3. *Bacillus megaterium*

Bei *B. megaterium* handelt es sich um ein Gram-positives, stäbchenförmiges, Endosporenbildendes Bakterium. Es wächst hauptsächlich aerob bei moderaten Temperaturen und bildet abhängig von der Wachstumsphase kettenförmige Strukturen. Beschrieben wurde es zum ersten Mal im Jahre 1884 von De Bary und erhielt seinen Namen auf Grund seiner überdurchschnittlichen Größe (megatherium, griechisch: großes Biest) (De Bary, 1884). Bei einer Größe von bis zu $1,5 \times 4 \mu\text{m}$ hat es ungefähr das 100-fache Volumen von *Escherichia coli*. Da das Bakterium somit verhältnismäßig gut zur visuellen Untersuchung geeignet ist, wurde es in der Vergangenheit vielfach zu Untersuchungen z.B. zur Zellmorphologie oder Sporulation eingesetzt (Vary *et al.*, 2007). Natürlicherweise kommt es in unterschiedlichen Habitaten wie dem Erdboden, Honig, Seewasser und vielen Weiteren vor. Diese große Bandbreite an Habitaten korreliert mit der Fähigkeit von *B. megaterium*, eine Vielzahl verschiedener C-Quellen zu nutzen (Vary, 1994). Diese Fähigkeit ist eine der Eigenschaften, die dieses Bakterium zu einem geeigneten Organismus für biotechnologische Anwendungen macht. Ein weiterer Vorteil ist das Fehlen von extrazellulären alkalischen Proteasen, die zusammen mit einem potenten Sekretionssystem eine effektive Produktion sekretierter Proteine ermöglicht (Malten *et al.*, 2005). Darüber hinaus hält *B. megaterium* eingebrachte Plasmide relativ stabil (Rygus und Hillen, 1991; Vary, 1994). So lassen sich rekombinante Plasmidstämme auch ohne Selektionsdruck durch Antibiotika lange kultivieren ohne die Plasmide zu verlieren, was für die Biotechnologie besonders wichtig ist (Meinhardt *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu Gram-negativen Produktionswirten wie *E. coli* verfügt es als Gram-positives Bakterium über keinerlei Außenmembran-assoziierte Lipopolysaccharide, die als

Endotoxine wirken können, und ist grundsätzlich als apathogen einzustufen. Dieses ist vor allem für die Pharma- und Lebensmittelindustrie von essentieller Bedeutung.

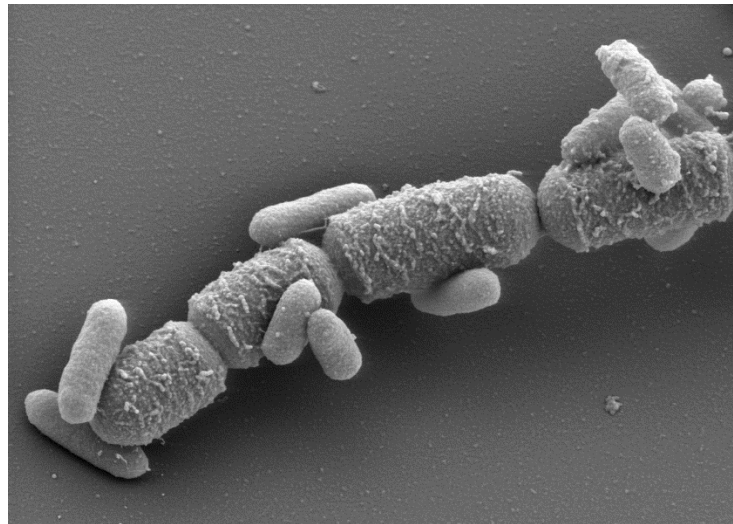


Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) von *B. megaterium* Zellen (große Zellen, kettenförmig) und *E. coli* Zellen (kleine Zellen) (Biedendieck, *et al.*, 2007).

Um ein Bakterium als biotechnologischen Produktionswirt optimal nutzen zu können, ist eine effiziente Methode zur genetischen Manipulation notwendig. Dies ermöglicht sowohl die grundlegende Erforschung des Organismus als auch eine Optimierung auf genetischer Ebene, die letztlich zu einer verbesserten Produktausbeute führen soll. Darüber hinaus ist für manche Anwendungen, z.B. dem Screening von Genbanken, eine sehr hohe Transformationseffizienz erforderlich.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist für *B. megaterium* die Polyethylenglykol-basierte Transformation von Protoplasten als Standardmethode etabliert (Von Tersch und Robbins, 1990). Diese Methode ergibt jedoch selbst unter optimalen Bedingungen eine zu geringe Transformationseffizienz, um für die zuvor erwähnten Anwendungen eingesetzt werden zu können. Auch die Methoden der Elektroporation (Moro *et al.*, 1995) und Transformation mittels Partikelkanone (Shark *et al.*, 1991) sind nur für einzelne Stämme mit geringer Effizienz beschrieben. Von Koehler und Thorne konnte gezeigt werden, dass sich *B. megaterium* mittels Konjugation transformieren lässt (Koehler und Thorne, 1987). Dabei findet der Transfer der DNA von einer *E. coli* Zelle zu *B. megaterium* statt. Bei dieser Methode ergibt sich jedoch die Notwendigkeit einer Selektion gegen die verwendeten *E. coli* Zellen, um eine reine *B. megaterium* Kultur zu erhalten. Diese stellt in der Praxis eine große Herausforderung dar, was auch die Anwendbarkeit dieser Methode beschränkt (Richhardt *et al.*, 2010; Ravinskaya, 2011). Insgesamt besteht daher ein großes Interesse daran,

alternative, effizientere Transformationsmethoden für *B. megaterium* zu etablieren. Als eine Möglichkeit kommt dabei die Transformation mittels natürlicher Kompetenz in Frage.

1.3.1. Natürliche Kompetenz in *Bacillus megaterium* und anderen Arten der Gattung *Bacillus*

Obgleich bei *B. megaterium* bisher noch keine natürliche Kompetenz beschrieben wurde, gibt es Hinweise darauf, dass es über diese Eigenschaft verfügt. So konnten bei der Genomanalyse des Stammes DSM-319 für fast alle Gene, die in *B. subtilis* essentiell für die natürliche Kompetenz sind, homologe Gene in *B. megaterium* DSM-319 identifiziert werden (Gamer, 2010; Eppinger *et al.*, 2011). Einzig für *comFB* konnte kein homologes Gen in *B. megaterium* DSM-319 identifiziert werden. Da das Protein ComFB in *B. subtilis* in dem *comFABC* Operon zusammen mit den an der natürlichen Kompetenz beteiligten Proteinen ComFA und ComFC codiert ist, wurde es üblicherweise als Kompetenz-assoziiertes Protein betrachtet. Im Gegensatz zu ComFA und ComFC konnte bei genaueren Untersuchungen für ComFB jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Protein und der natürlichen Kompetenz festgestellt werden (Sysoeva *et al.*, 2014). Eine Deletion des Gens zeigte in *B. subtilis* keine negative Auswirkung auf die Ausbildung der natürlichen Kompetenz. Genomanalysen haben ergeben, dass das *comFB* Gen neben *B. megaterium* DSM-319 auch bei einigen anderen *Bacillus* Arten fehlt (Kovács *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Funktion von ComFB gibt es keine genaueren Informationen, wobei derzeit jedoch eine regulatorische Funktion diskutiert wird (Sysoeva *et al.*, 2014). Somit sollte das Fehlen des *comFB* Gens in *B. megaterium* DSM-319 keine Auswirkung auf die mögliche Ausbildung der natürlichen Kompetenz darstellen.

Tabelle 1.1. Bioinformatische Identifizierung von Kompetenz-assoziierten Proteinen in *B. megaterium* DSM-319. Auf Basis des *B. megaterium* DSM-319 Genoms wurde nach Proteinen gesucht, die Homologien zu Kompetenz-assoziierten Proteinen in *B. subtilis* 168 aufweisen. Die Proteinsequenzen, Funktion und Protein ID (nach GenBank) wurden aus der MegaBac Datenbank (Version 9) gewonnen und mittels BLAST analysiert. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich der „E-value“ und die „%-Identität“ auf die gleichnamigen Proteine aus *B. subtilis* 168.

Protein	Funktion	Protein ID (GenBank)	E-value (BLAST)	% Identität
AddA	ATP-abhängige Desoxyribonuklease	ADF37507	0	55,5
AddB	ATP-abhängige Desoxyribonuklease	ADF37506	0	50,8
BdbC	Thiol-Disulfid Oxidoreduktase (Pseudopilus Bildung)	ADF40029	2xe ⁻³⁴	58,3
BdbD	Thiol-Disulfid Oxidoreduktase (Pseudopilus Bildung)	ADF40030	5xe ⁻²⁷	35,1
CoiA	Kompetenz-Protein CoiA	ADF37584	4xe ⁻⁴¹	27
ComC	Präpilin-Peptidase	ADF41483	6xe ⁻⁴⁶	42,2
ComEA	Bindung exogener DNA	ADF41387	3xe ⁻³⁶	43,3
ComEB	Bindung und Aufnahme von DNA	ADF41386	6xe ⁻⁷⁸	67,2
ComEC	Aufnahme von DNA	ADF41385	3xe ⁻¹³¹	37,1
ComFA	Aufnahme von DNA	ADF41903	1xe ⁻¹³⁰	46
ComFB	Aufnahme von DNA	-	-	-
ComFC	Aufnahme von DNA	ADF41902	3xe ⁻³¹	34,8
ComGA	NTPase	ADF41310	8xe ⁻¹²⁵	57,9
ComGB	Aufbau des Pseudopilus	ADF41309	4xe ⁻⁴¹	27,3
ComGC	Hauptkomponente des Pseudopilus	ADF41308	8xe ⁻¹²	48,1
ComGD	Neben-Pilin	ADF41307	1xe ⁻⁰⁵	45,8
ComGE	Neben-Pilin	ADF41306	0,004	37,0
ComGF	DNA-Transportmaschinerie	ADF41305	8xe ⁻⁰⁶	46,2
ComGG	Neben-Pilin	ADF41304	40	23,5
ComK	Kompetenz Transkriptionsfaktor	ADF37998	3xe ⁻⁰⁷	20
DprA	DNA-prozessierendes Protein	ADF41020	1xe ⁻⁶²	43,2
Med	Regulator von comK	ADF37213	3xe ⁻³³	28,7
Nin	Inhibitor der NucA Aktivität	ADF40701	3xe ⁻²⁹	45,2
NucA	Membran-assoziierte Nuklease	ADF40101	3xe ⁻⁴²	53,7
RadC	DNA-Reparatur-Protein	ADF41480	5xe ⁻⁸⁴	70,1
RecA1	Homologe Rekombination und DNA Reparatur	ADF38581	2xe ⁻¹⁴⁸ (zu RecA)	78,6
RecA2	Homologe Rekombination und DNA Reparatur	ADF40936	2xe ⁻¹⁶⁷ (zu RecA)	86,5
SsbA	Einzelstrang-DNA-bindendes Protein	ADF42051	2xe ⁻⁶¹	74
SsbB	Einzelstrang-DNA-bindendes Protein	ADF41920	3xe ⁻³⁰	53,3

Grundsätzlich sollte *B. megaterium* also in der Lage sein, einen funktionellen DNA-Aufnahme-Apparat auszubilden und die DNA ins Genom zu integrieren. Die regulatorischen Grundlagen hierfür sind derzeit jedoch völlig unklar.

Bei ersten Untersuchungen zu natürlicher Kompetenz in *B. megaterium* konnte festgestellt werden, dass die Überproduktion von ComK_{Bmeg} (ComK aus *B. megaterium*) zur Zelllyse führt (Fröde, 2008; Gamer, 2010). Dabei ist jedoch nicht klar, ob es sich um einen spezifischen Effekt von ComK_{Bmeg} oder einen unspezifischen Effekt durch die Menge des

überproduzierten Proteins handelt. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeiten kein Hinweis darauf gefunden werden, dass ComK_{Bmeg} zu einer Induktion der Transkription Kompetenz-assoziiierter Gene beiträgt. Dasselbe trifft auf die heterologe Produktion von ComK_{Bsub} in *B. megaterium* zu. Insgesamt ist daher davon auszugehen, dass ComK_{Bmeg} nicht die Funktion eines zentralen und einzigen Regulators der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* ausübt. Falls *B. megaterium* also zur Ausbildung natürlicher Kompetenz fähig ist, scheint sich deren Regulation von der in *B. subtilis* 168 zu unterscheiden.

Neben dem Modellorganismus *B. subtilis* 168 konnte natürliche Kompetenz bisher in zwei anderen Arten der Gattung *Bacillus* nachgewiesen werden. So konnte natürliche Kompetenz bei einigen *Bacillus licheniformis* und *Bacillus amyloliquifaciens* Stämmen gezeigt werden (Thorne und Stull, 1966; Koumoutsi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2010; Jakobs *et al.*, 2014). Interessanter Weise handelt es sich bei zwei *B. licheniformis* Stämmen mit hoher Transformationseffizienz um Derivate des Stammes 9945A, die durch mehrfache ungerichtete Mutagenese erzeugt wurden. Dieses entspricht der Situation in *B. subtilis*, bei dem der Stamm *B. subtilis* 168, der eine deutlich höhere Transformationseffizienz aufweist als sein Parentalstamm *B. subtilis* NCIB 3610, ebenfalls durch mehrfache ungerichtete Mutagenese erzeugt wurde (Zeigler *et al.*, 2008; Nijland *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung der beiden *B. licheniformis* 9945A Derivate M28 und M18 konnte je eine Mutation identifiziert werden, die zu der erhöhten Transformationseffizienz führt (Jakobs *et al.*, 2014). Bei M28 handelt es sich um eine 14 bp Deletion im Gen *degS*, das für eine Sensor-Histidinkinase codiert und an der Regulation von Prozessen wie natürlicher Kompetenz, Biofilmbildung und anderen beteiligt ist (Hamoen, 2003). Für das Derivat M18 wurde eine 375 bp Deletion in dem Gen *abrB* identifiziert, das für den globalen Regulator AbrB codiert. Dieser Regulator ist ebenfalls an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie unter anderem der natürlichen Kompetenz, beteiligt (Chumsakul *et al.*, 2011).

Bei *Bacillus amyloliquifaciens* lässt sich der Stamm FZB42 mit einem für *B. subtilis* entwickelten Protokoll mittels natürlicher Kompetenz transformieren (Kunst und Rapoport, 1995). Genomanalysen haben gezeigt, dass dieser Stamm (ähnlich wie *B. megaterium* DSM-319) über alle zur Ausbildung der natürlichen Kompetenz benötigten Gene verfügt. Über die Regulation der natürlichen Kompetenz in *B. amyloliquifaciens* FZB42 ist derzeit jedoch nichts bekannt.

Zusätzlich zu *B. licheniformis* und *B. amyloliquifaciens* konnte natürliche Kompetenz in *Bacillus cereus* künstlich induziert werden (Mirończuk *et al.*, 2008). Dabei wurde der zentrale Regulator der Kompetenz ComK aus *B. subtilis* 168 rekombinant in *B. cereus* ATCC14579 produziert. In Folge der Produktion von ComK_{Bsub} kam es zur Transformation mittels

natürlicher Kompetenz. Ob *B. cereus* ohne diese künstliche Induktion zur Ausbildung der natürlichen Kompetenz in der Lage ist, ist jedoch nicht bekannt.

Diese Beispiele zeigen, dass natürliche Kompetenz nicht auf *B. subtilis* beschränkt ist und unterstützen die Annahme, dass auch *B. megaterium* zur ihrer Ausbildung befähigt sein könnte.

1.3.2. Rekombinante Proteinproduktion mit *Bacillus megaterium*

Eine der biotechnologischen Anwendungen, für die *B. megaterium* besonders gut geeignet ist, ist die Produktion extrazellulärer rekombinanter Proteine. Gegenüber der intrazellulären Produktion hat die Produktion von sekretierten Proteinen einige Vorteile. Dazu gehören unter anderem ein deutlich einfacheres Downstream-processing sowie die Möglichkeit der kontinuierlichen Kultivierung. Allerdings ist die Produktausbeute von sekretierten Proteinen im Vergleich zu intrazellulären Proteinen deutlich geringer. So kann beispielsweise intrazellulär 1,25 g/l Gfp (Green fluorescent protein) produziert werden, während die extrazelluläre Produktion von Penicillin G Acylase eine Ausbeute von 40 mg/l ergibt (Yang *et al.*, 2006). Angesichts dessen besteht ein großes Interesse daran, den Vorgang der Proteinsekretion hinsichtlich einer höheren Produktausbeute zu optimieren.

1.4. Proteinsekretion in *Bacillus* spp.

In *Bacillus* spp. sind insgesamt fünf verschiedene Sekretionsmechanismen für Proteine bekannt (Ling Lin Fu *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um den SEC-Pathway, die Sekretion von Lipoproteinen, den TAT-Pathway, die Sekretion über ABC-Transporter und die Typ 4 Pilin Sekretion.

Bei dem SEC-Pathway werden die Proteine in ungefaltetem Zustand aus der Zelle transportiert und nehmen erst dann ihre finale Konformation ein. Außerhalb der Zelle verbleiben die Proteine entweder an der Zellwand assoziiert oder diffundieren frei in das umgebende Medium (Tjalsma, *et al.*, 2004). Die Sekretion von Lipoproteinen erfolgt weitgehend über denselben Pathway, jedoch werden die Proteine nach dem Verlassen der Zelle über einen Cystein-Anker an die Zellmembran gebunden (Tjalsma *et al.*, 2000; Dalbey *et al.*, 2012). Bei dem TAT-Pathway wiederum nehmen die Proteine bereits in der Zelle ihre finale Konformation ein und werden dann aus der Zelle transportiert. Dieses erlaubt den Einbau von Co-Faktoren und die Modifikation der Proteine in der Zelle, was essentiell für die Funktion einiger Proteine ist (Sanders *et al.*, 2001; Palmer und Berks, 2003). Ein vierter Weg zu Sekretion von Proteinen bei *Bacillus* spp. erfolgt über ABC-Transporter (Quentin *et al.*, 1999). Hierbei werden Bacteriocine und Pheromone aus der Zelle in die Umgebung transportiert. Bei diesen Proteinen kann es sich sowohl um ribosomal als auch nicht-

ribosomal synthetisierte Proteine handeln. Der letzte Mechanismus ist schließlich die Sekretion von Typ 4 Pilinen. Die Typ 4 Piline sind mit der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* assoziiert, wobei sie den an der Bindung von extrazellulärer DNA beteiligten Pseudopilus bilden. Derzeit sind für *B. subtilis* vier Proteine bekannt, welche über diesen Weg transportiert werden (ComGC, ComGD, ComGE, ComGG) (Dubnau, 1997; Tjalsma *et al.*, 2004).

Bei der Untersuchung der verschiedenen Sekretionsmechanismen in *B. subtilis* konnte festgestellt werden, dass ~90% aller sekretierten Proteine über den SEC-Pathway sekretiert werden (Yamane *et al.*, 2004). Somit ist er der wichtigste und auch für biotechnologisch Anwendungen relevanteste Mechanismus.

1.4.1. SEC-Pathway

Bei dem SEC-Pathway wird das zu sekretierende Protein in ungefaltetem Zustand aus der Zelle transportiert (Abb. 1.6). Die Faltung findet dann außerhalb der Zelle statt, wobei verschiedene Chaperone beteiligt sein können. Proteine die zur Sekretion bestimmt sind verfügen über ein so genanntes Signalpeptid. Dabei handelt es sich um eine im N-terminalen Teil des zu sekretierenden Proteins lokalisierte Aminosäuresequenz. Dieses Signalpeptid wird bereits während der Translation von einer Komponente des SEC-Systems, dem SRP (signal recognition particle), erkannt, während Chaperone eine Faltung des gesamten Proteins verhindern. Das SRP selbst besteht aus den Proteinen Fth und HBSu (2 Monomere) sowie einer kleinen cytoplasmatischen RNA (scRNA) (Fu *et al.*, 2007). Mit Hilfe des Proteins FtsY wird dieser SRP-Protein-Komplex dann zu der eigentlichen Pore in der Zellmembran geführt, durch die im weiteren Verlauf das zu sekretierende Protein aus der Zelle gebracht wird. Die Pore ist aus den drei Transmembranproteinen SecY, SecE und SecG zusammengesetzt. An dem aktiven Transport des noch ungefalteten Proteins durch die Pore ist das Motorprotein SecA beteiligt. Dieses übernimmt das Protein von dem SRP-Komplex und schleust es unter ATP-Verbrauch durch die SecYEG-Pore. Zusätzlich scheinen die Proteine SecD und SecF an diesem Prozess beteiligt zu sein, deren genaue Funktion derzeit aber noch Gegenstand der Forschung ist. Auf der extrazellulären Seite der Zellmembran erfolgt anschließend die Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids durch eine membranständige Typ I Peptidase. Das nun freie Protein faltet sich autokatalytisch oder mit Unterstützung von extrazellulären Foldasen wie PrsA in seine funktionelle Konformation (Tjalsma, *et al.*, 2004).

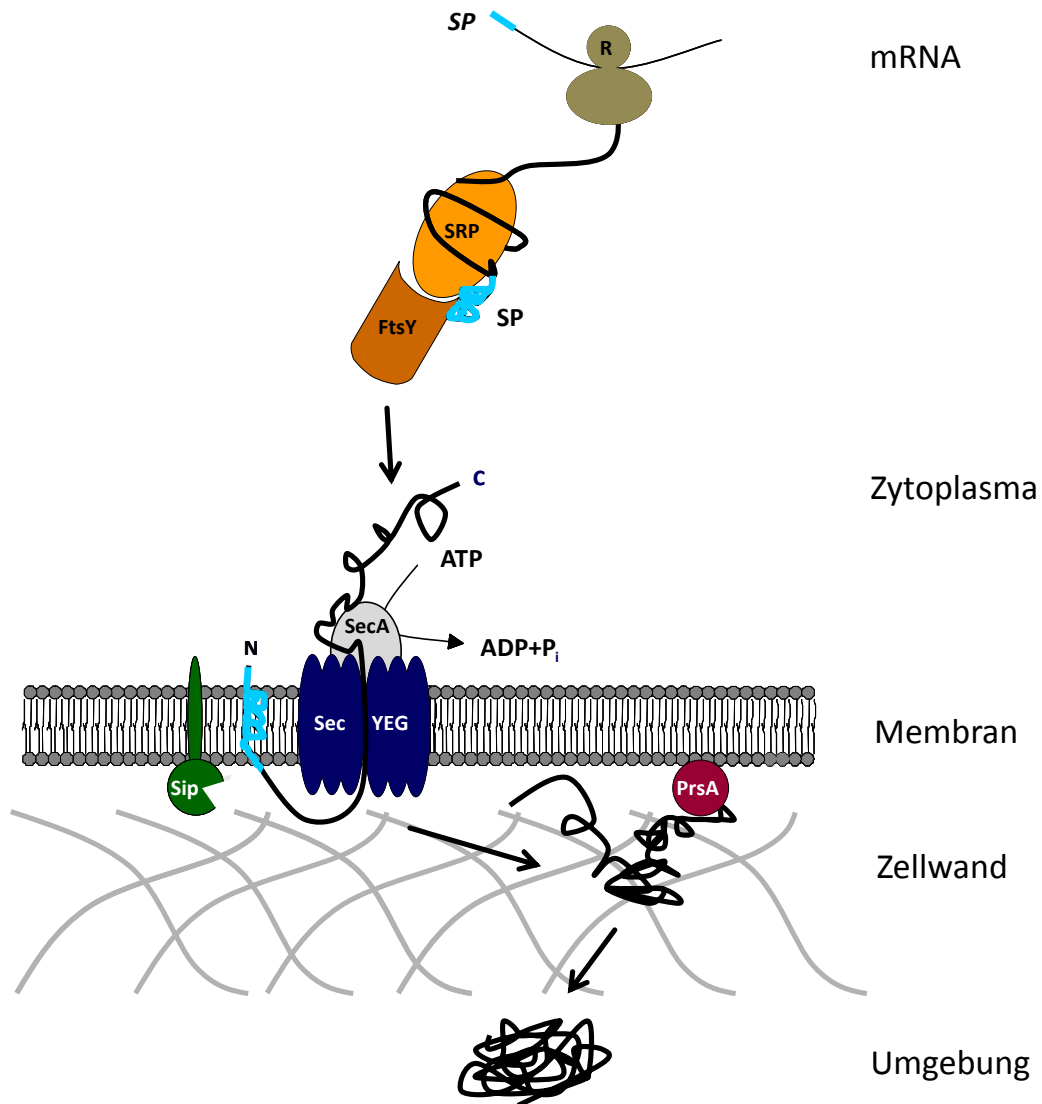


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Proteinsekretion über den SEC-Pathway in *B. subtilis*. Die für das zu sekretierende Protein codierende mRNA wird samt N-terminalem Signalpeptid (SP, hellblau) am Ribosomen (R, oliv) translatiert. Das signal recognition particle (SRP, orange) erkennt direkt nach der Translation das SP und bindet an das ungefaltete Protein. Dieser Komplex wird vom Protein FtsY (dunkles orange) zur SecYEG-Pore (dunkelblau) transportiert. Das zu sekretierende Protein wird unter ATP Verbrauch von dem Motorprotein SecA (grau) durch die SecYEG-Pore geschleust. Das Signalpeptid wird außerhalb der Zelle von einer Signalpeptidase I (Sip, grün) vom sekretierten Protein proteolytisch abgespalten. Das freie Protein faltet sich, teilweise unter Hilfe von Chaperonen wie PrsA (rot), zu seiner funktionellen Konformation und verbleibt an die Zellwand gebunden oder diffundiert in die Umgebung (modifiziert nach Biedendieck (2006)).

1.4.1.1. Signalpeptide des SEC-Pathways

Bei dem hier beschriebenen Mechanismus des SEC-Pathways wird deutlich, dass das Signalpeptid eine essentielle Rolle einnimmt. Interessanterweise gibt es in einem Organismus jedoch nicht nur eine Art von Signalpeptid, das bei jedem sekretierten Protein zu finden ist, sondern eine große Vielfalt. So konnten beispielsweise in *B. subtilis* für den SEC-Pathway 166 verschiedene Signalpeptide mit einer Länge zwischen 19 und 44 Aminosäuren

bioinformatisch vorhergesagt werden (Tjalsma *et al.*, 2000). Obwohl die einzelnen Signalpeptide unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen, können sie grundsätzlich in drei verschiedene Regionen mit konservierten Eigenschaften unterteilt werden (Abb. 1.7). Bei diesen Bereichen handelt es sich um die N-terminale positiv geladene „N-Region“, die zentrale hydrophobe „H-Region“ und die polare C-terminale „C-Region“. Im Zuge der Sekretion wird das Signalpeptid von dem eigentlichen Protein abgeschnitten. Für diesen Vorgang ist eine in der C-Region lokalisierte Erkennungssequenz verantwortlich. Diese Sequenz wird nach dem Transport des Proteins durch die SecYEG-Pore von einer Signalpeptidase erkannt und führt zu einer proteolytischen Abspaltung des Signalpeptids an einer definierten Stelle. Bei Prokaryoten besteht die Erkennungssequenz aus den drei C-terminalen Aminosäuren des Signalpeptids und hat die Konsensussequenz A-X-A (A: Alanin; X: beliebige Aminosäure). Die Nummerierung der Aminosäurepositionen erfolgt ausgehend von der Schnittstelle der Peptidase, somit erhält man also die Positionen: -3 (A), -2 (X) und -1 (A). Die Konsensussequenz erlaubt gewisse Abweichungen. So kann an der Position -1 auch ein Valin vorkommen. Für die Position -2 konnten bisher abgesehen von Cystein und Prolin alle Aminosäuren gefunden werden, während an der -3 Position scheinbar ein Alanin zwingend ist. Für die +1 Position, also die erste Aminosäure des eigentlichen Proteins, scheint wiederum eine Präferenz für Alanin vorzuliegen, wobei abgesehen von Cystein und Prolin auch alle anderen Aminosäuren zu finden sind (Tjalsma *et al.*, 2000).

Hinsichtlich der verschiedenen Signalpeptide (166 in *B. subtilis*) lässt sich beobachten, dass sie einen Einfluss auf die Menge des sekretierten Proteins haben. Ein und dasselbe zu sekretierende Protein wird abhängig vom jeweils angefügten Signalpeptid in unterschiedlichen Mengen sekretiert (Brockmeier *et al.*, 2006). Dieses lässt sich auf die verschiedenen Aminosäuresequenzen der Signalpeptide zurückführen, wodurch sich Unterschiede in der Interaktion mit den anderen Komponenten des Sekretionsapparates ergeben können. Darüber hinaus interagiert das Signalpeptid mit dessen zu sekretierenden, C-terminal lokalisierten Protein. Diese Wechselwirkungen haben ebenfalls einen Einfluss auf das Zusammenwirken mit den Komponenten des Sekretionsapparates.

Insgesamt ergibt sich daraus ein überaus komplexes System aus Interaktionen. Auf Grund dessen ist es zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, bioinformatische Vorhersagen über die Sekretionseffizienz eines Signalpeptids im Zusammenhang mit dem zu sekretierenden Protein zu treffen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass für ein gewünschtes Protein jede Signalpeptid-Protein Kombination experimentell getestet werden muss, um das am besten geeignete Signalpeptid zu identifizieren.

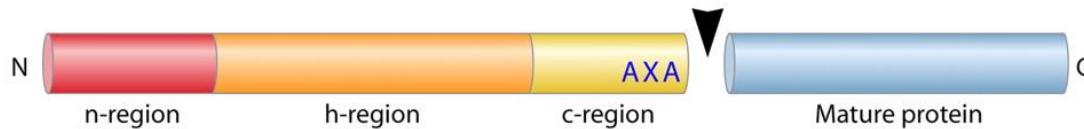


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des konservierten Aufbaus eines Signalpeptids des SEC-Pathways mit Signalpeptidase I (SPaseI) Schnittstelle und N-Terminus des zu sekretierenden Proteins. Dargestellt sind die N-terminale (N) positiv geladene „n-region“ (rot), die hydrophobe „h-region“ (orange), die polare „c-region“ (gelb), die SPaseI Konsensus-Erkennungssequenz „A-X-A“ (A: Alanin, X: beliebige Aminosäure) am C-Terminus der „c-region“, die SPaseI-Schnittstelle (schwarzer Pfeil) und der N-terminale Teil des zu sekretierenden Proteins (blau) (Dalbey *et al.*, 2012).

1.4.2. Sekretion rekombinanter Proteine in *Bacillus megaterium* über den SEC-Pathway

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *B. megaterium* gut zur Produktion und Sekretion rekombinanter Proteine geeignet ist (Korneli *et al.*, 2013), wobei zur Sekretion der Proteine der SEC-Pathway genutzt wurde. Als Signalpeptid wurde dabei meist das Signalpeptid der extrazellulären Esterase LipA verwendet (SP_{LipA}) (Ruiz *et al.*, 2002). Damit konnten unter anderem eine α -Cyclodextrin Glycosyltransferase (Zhou *et al.*, 2012), eine Penicillin G Amidase (Yang *et al.*, 2006), das S-layer Protein SslA aus *Sporosarcina ureae* ATCC 13881 (Knobloch *et al.*, 2012), das Lysozym-spezifische „single chain Fv (scFv)“ Antikörperfragment D1.3scFv (Jordan *et al.*, 2007) sowie eine Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* (Malten *et al.*, 2006; Biedendieck *et al.*, 2007) erfolgreich in *B. megaterium* produziert und sekretiert werden. Darüber hinaus konnte eine erfolgreiche Sekretion der Levansucrase SacB aus *B. megaterium* (Korneli, *et al.*, 2013), der Dextransucrase DsrS aus *Leuconostoc mesenteroides* (Malten *et al.*, 2005) und der Penicillin G Acylase Pac (Panbangred *et al.*, 2000), mit ihren jeweiligen nativen Signalpeptiden (SP_{SacB}, SP_{DsrS}, SP_{Pac}) gezeigt werden. Bei den hier aufgeführten Beispielen wurden keine vergleichenden Studien mit verschiedenen Signalpeptiden durchgeführt. Wie für *B. subtilis* gezeigt, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Sekretionseffizienz dieser rekombinant produzierten Proteine durch Veränderung des Signalpeptids auch in *B. megaterium* steigern ließe (Brockmeier *et al.*, 2006).

Bei *B. megaterium* konnte mit der Hydrolase Tfh aus *Thermobifida fusca* durch Stammen *et al.* erstmals der Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die Sekretionseffizienz gezeigt werden (Stammen *et al.*, 2010). Bei der vergleichenden Analyse von acht Signalpeptiden wurden dabei, analog zu *B. subtilis*, deutliche Unterschiede in der Sekretionseffizienz festgestellt. Die Unterschiede zwischen der höchsten und geringsten Sekretionseffizienz lag

dabei bei einem Faktor von ~14. In dieser Studie wurde neben bereits für *B. megaterium* etablierten Signalpeptiden auch eine Codon-optimierte Version eines Signalpeptids sowie ein artifizielles Signalpeptid, dass eine Konsensussequenz aller bekannten Signalpeptide aus Gram-positiven Bakterien darstellt, verwendet. Bei der Untersuchung dieser Signalpeptide war kein Zusammenhang zwischen der Menge an sekretiertem Protein und bioinformatischen Vorhersagen für die Signalpeptide feststellbar. Es scheint also, dass auch für *B. megaterium* jedes einzelne Signalpeptid experimentell auf seine Sekretionseffizienz, im Kontext mit dem zu sekretierenden Protein, analysiert werden muss.

1.5. Zielsetzung

Bacillus megaterium wird seit vielen Jahren für die rekombinante Produktion von Proteinen eingesetzt. Um seine biotechnologische Anwendung in Richtung Screening von Genbanken zu erweitern, ist die Entwicklung einer effizienten Transformationsmethode mit sehr hohen Transformationsraten unerlässlich. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, das System *B. megaterium* in Richtung dieser neuen Anwendungen weiter zu entwickeln und zu optimieren.

Die DNA-Aufnahme über natürliche Kompetenz ist für *B. subtilis* als sehr effizient beschrieben. Daher wurden im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Ausbildung von natürlicher Kompetenz in unterschiedlichen *B. megaterium* Stämmen (Kapitel 3.1) sowie die Regulation der Expression der Kompetenz-assoziierten Gene/Operons *comGABCDEFGG*, *comFA*, *comK* und *ssbB* in den *B. megaterium* Stämmen DSM-319 und MS-941 (DSM-319 $\Delta nprM$) (Kapitel 3.2, 3.3) untersucht. Dazu sollte zunächst ein neues Reportersystem, basierend auf dem bakteriellen Luziferase-System, zur Analyse von Promotor-Fusionen in *B. megaterium* entwickelt und dieses anschließend zur Identifizierung von Kompetenz-induzierenden Bedingungen angewandt werden.

Neben den Analysen zur Regulation der Expression von *comK_{Bmeg}* sollte auch dessen Genprodukt ComK_{Bmeg} funktionell analysiert werden, da ComK aus *B. subtilis* als zentraler Regulator der Kompetenz bekannt ist. Dazu mussten zunächst geeignete Expressionssysteme zur rekombinanten Überproduktion in *E. coli* und Reinigung gefunden werden, um es im Folgenden in DNA-Bindestudien mit vorhergesagten DNA-Binderegionen einzusetzen (Kapitel 3.4).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein erstes plasmidbasiertes Screening-Set für *B. megaterium* entwickelt werden. Da *B. megaterium* als Gram-positiver Organismus sehr gut zur Sekretion von Proteinen in großen Mengen geeignet ist, wurde ein System zur Analyse von Funktionalität und Effizienz von Signalpeptiden des SEC-Pathways aus *B. megaterium* DSM-319 gewählt. Dazu musste zunächst ein geeigneter Basis-Vektor konstruiert und ein Modell-Protein gefunden werden, mit dem eine einfache Quantifizierung der Sekretionsstärke möglich war. Im Folgenden wurden bioinformatisch alle sekretierten Proteine aus DSM-319 vorhergesagt und deren Signalpeptide analysiert. Basierend auf diesen Analysen sollten als „proof of principle“ eine Reihe von Signalpeptiden ausgewählt, entsprechend kloniert und *in vivo* getestet werden, um abschließend erste Erkenntnisse über Zusammenhang von bioinformatischen Daten zu Funktionalität und Effizienz dieser Signalpeptide aus *B. megaterium* treffen zu können (Kapitel 3.5).

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Chemikalien

2.1.1. Geräte und technische Anlagen

Die in dieser Arbeit verwendeten technischen Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und technische Anlagen.

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Agagel	Biometra
Autoklav	LVSY 50/70	Zirbus
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Blauschirm	Flu-O-blu	Biozym
Blotapparatur	Semidry-Blot Trans-Blot SD	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M; AxioCam HR/ApoTome Illuminator HB0/HAL100	Carl Zeiss
Geldokumentationsanlage	DeVision G	Decon Science Tec
Kulturschüttler	TR-150	Infors
Magnetrührer	Reo	IKA-Labortechnik
Microarray-Hybridisierungssofen	DNA Microarray Hybridization Oven	Agilent Technologies
Microarray-Hybridisierungskammer	DNA Microarray Hybridization Chamber SureHyb	Agilent Technologies
Microarray-Scanner	High-Resolution Microarray Scanner	Agilent Technologies
Microplate-Reader	VarioSkan Flash	Thermo Scientific
Mikrowelle	Alaska	SIG GmbH
Nanodrop Photometer	NanoDrop ND-1000	PeqLab
pH-Meter	pH-Meter C 6840 B	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Biochrom
Pipetten	LABMATE	Abimed HTL
Reinstwasser-Anlage	Milli-Q System	Millipore
SDS-PAGE-Kammer	Mini Protean III	Bio-Rad
Stromquelle	Standard Power Pack P25	Biometra

Gerät	Modell	Hersteller
Thermocycler	Tpersonal	Biometra
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Waagen	BP61S	Sartorius
	SBA 52	Scaltec
Wasserbadschüttler	Aquatron AI 15	Infors
Zellaufschlussgeräte	FastprepTM-24	MP Biomedicals
	Sonoplus-Ultraschall Homogenisator	Bandelin
Zentrifugen	Avanti J-30I	Beckman Coulter
	Avanti J-E	Beckman Coulter
	Biofuge fresco	Heraeus
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Megafuge 1.0R	Heraeus
	Minispin	Eppendorf

2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Materialien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Reagenzien und Materialien sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Materialien.

Produkt	Name/Beschreibung	Hersteller
96-well Platten	Kaminform 96 K; 127,8/86/15 mm; weiß; transparenter, flacher Boden Polystyrol	Greiner Bio-one
Affinitätsmaterial für Proteinreinigung	Amylose Resin	New England Biolabs
Affinitätsmaterial für Proteinreinigung	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Amylase Test Kit	Phadebas Amylase test (50)	Magle Life Sciences
Anionenaustauschchromatographie Säulenmaterial	Q-Sepharose	GE Healthcare
Antikörper	Anti-Glutathione-S-Transferase (Rabbit)	Sigma

Produkt	Name/Beschreibung	Hersteller
Benzonase	Benzonase Nuclease, Purity > 90%	Merck
Blotmembran	Roti-PVDF Transfer Membran	Roth
Blotpapier (Whatmanpaper)	Gel-Blotting-Papier (150 mm)	Neolab
DNA Größenstandard für Gelelektrophorese	GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
DNA-Fluoreszenzfarbstoff	GelStar Nucleic Acid Gel Stain	Lonza
DNA-Ligase	T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
DNA-Polymerasen	Phusion	New England Biolabs
DNA-Reinigungskits	QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN
	QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
DNA-Verdau	DNase (2 U/μl)	Ambion
Kationenaustauschchromatographie Säulenmaterial	SP-Sepharose	GE Healthcare
Oligonukleotide	diverse	Biomers.net
Proteasen	Enterokinase	New England Biolabs
	PreScission	Persönliche Gabe, AG Layer
Protein Größenstandard für Gelelektrophorese	Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Restriktionsenzyme	diverse	New England Biolabs
RNA-Fragmentierung	Agilent Fragmentierungskit	Agilent Technologies
RNA-Markierung	Labeling Kit USL Fluorescent (Labeling Kit für Agilent arrays)	Kreatech
RNA-Reinigung	innuPrep RNA Mini Kit	Analytik Jena
Site-Directed Mutagenesis	QuikChange II	Agilent Technologies
Sterilfilter	Nitrozellulose, Ø 0,2 μm	Millipore
Umpufferungssäule	Nap-25-Säule	GE Healthcare

2.2. Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* und *B. megaterium* Stämme sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i>		
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) f80d <i>lacZ</i> DM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Life technologies
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal</i>	Stratagene
ER2523 (NEB Express)	<i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> R(<i>mcr</i> -73::miniTn10--TetS)2 [<i>dcm</i>] R(<i>zgb</i> -210::Tn10--TetS) <i>endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10	New England Biolabs
<i>B. megaterium</i>		
DSM-319	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
MS-941	DSM-319-Derivat; Δ <i>nprM</i>	(K D Wittchen und Meinhardt, 1995)
MS-942	DSM-319-Derivat; Δ <i>nprM</i> , Δ <i>leuB</i>	Persönliche Gabe; Prof. Meinhardt, Münster
DSM-1517	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-1804	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-32	Wildtyp, Typstamm	DSMZ*, Braunschweig
DSM-321	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-3228	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-337	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-3641	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
DSM-509	Wildtyp	DSMZ*, Braunschweig
<i>B. subtilis</i>		
168	WT, UD+, <i>trpC2</i>	(Spizizen, 1958)

*Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.2.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide.

Plasmidname	Beschreibung	Quelle/Referenz
p3STOP1623hp	Shuttlevektor: Klonierung in <i>E. coli</i> (Amp ^r), Proteinproduktion in <i>B. megaterium</i> (Tet ^r); optimierter Xylose-induzierbarer Promotor; P _{xylA} (-35 ⁺ +rbs ⁺)-mcs-3stop-codons;	(Stammen <i>et al.</i> , 2010)
p3STOP1623hp-MCS-HIS	p3STOP1623hp-Derivat; zusätzliche MCS (KasI/MluI/AvrII/NotI/NheI/Agel), HIS ₆ -Tag und Stop-codon mit Oligonukleotiden über Agel eingebracht	Diese Arbeit
pBC16-1	<i>Bacillus</i> -Vektor; Tet ^r (<i>B. megaterium</i>); Sequenz und Größe (abweichend von Kreft <i>et al.</i> , 1978) abgeleitet aus pBC16 (GenBank: U32369.1), EcoRI verdaut und religiert	(Kreft <i>et al.</i> , 1978)
pDF _{gfp}	pYZ5-Derivat; 767 bp großes PCR-Fragment mit <i>gfp</i> aus pRBBm34 über EcoRI und KpnI	(Gamer, 2010)
pEJBmD1.3scFv	Produktion/Sekretion des single chain Antikörperfragments D1.3scFv in <i>B. megaterium</i> (Tet ^r); Xylose induzierbarer Promotor (P _{xylA}); codon-optimierte Gensequenzen für Signalpeptid von LipA, C-terminalen His ₆ -Tag + T4 Terminator	(Jordan <i>et al.</i> , 2007)
pFU36	Vektor für Genexpressionsstudien; Reporter: rbs- <i>luxCDABE</i> ; Amp ^r	(Uliczka <i>et al.</i> , 2011) GenBank: JF796081.1
pGEX-6P-1	Expressionsvektor für rekombinante Proteinproduktion in <i>E. coli</i> (Amp ^r), N-terminaler Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag), Linker mit PreScission Protease Schnittstelle	GE Healthcare
pSWEc3	pGEX-6P-1-Derivat; codierende Sequenz für <i>comK</i> _{Bmeg} aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über EcoRI und XhoI eingefügt; Fusion mit N-terminalem GST-Tag „in frame“	(Wienecke, 2012)
pTKBm05	pDF _{gfp} -Derivat; Promotorfragment von <i>comK</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über XbaI und SpeI eingebracht; P _{comK-gfp}	Diese Arbeit
pTKBm06	pDF _{gfp} -Derivat; Promotorfragment von <i>comG</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über SpeI und KpnI eingebracht; P _{comG-gfp}	Diese Arbeit
pTKBm06/2	pTKBm06-Derivat; Sall (6 bp upstream von <i>gfp</i>) Schnittstelle über Quikchange eingeführt	Diese Arbeit
pTKBm08	p3STOP1623hp-Derivat; rbs- <i>luxCDABE</i> Reportergene aus pFU36 über BamHI und EagI downstream von P _{xylA} kloniert; P _{xylA-luxCDABE}	Diese Arbeit

Plasmidname	Beschreibung	Quelle/Referenz
pTKBm09	pTKBm06/2-Derivat; Sall (6 bp upstream von <i>gfp</i>) und NotI (34 bp upstream des <i>gfp</i> stop-codons) Schnittstellen über Quikchange eingeführt	Diese Arbeit
pTKBm10	pTKBm09-Derivat; <i>rbs-luxCDABE</i> aus pTKBm08 über Sall und NotI eingebracht; <i>PcomG-luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm11	pTKBm10-Derivat; Negativkontrolle; Promotorfragment von <i>comG</i> aus pTKBm10 über BamHI und Sall ausgeschnitten, blunt ends erzeugt, ligiert; ohne Promotor upstream von <i>luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm12	pTKBm10-Derivat; Promotorfragment von <i>ssbB</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über BamHI und Sall eingebracht; <i>PssbB-luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm13	pTKBm10-Derivat; Promotorfragment von <i>comK</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über BamHI und Sall eingebracht; <i>PcomK-luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm14	pTKBm10-Derivat; Promotorfragment von <i>comE</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über BamHI und Sall eingebracht; <i>PcomE-luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm15	pTKBm10-Derivat; Promotorfragment von <i>comF</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über BamHI und Sall eingebracht; <i>PcomF-luxCDABE</i>	Diese Arbeit
pTKBm16	pTKBm06-Derivat; Promotorfragment von <i>ssbB</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über KpnI und SpeI eingebracht; <i>PssbB-gfp</i>	Diese Arbeit
pTKBm17	pTKBm06-Derivat; Promotorfragment von <i>comE</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über KpnI und SpeI eingebracht; <i>PcomE-gfp</i>	Diese Arbeit
pTKBm18	pTKBm06-Derivat; Promotorfragment von <i>comF</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM-319 über KpnI und SpeI eingebracht; <i>PcomF-gfp</i>	Diese Arbeit
pYZ5	Verkürzte Form von pYZ11 (Kunnimalaiyaan <i>et al.</i> , 2001); Shuttlevektor: Klonierung in <i>E. coli</i> (Amp ^r), Replikation in <i>B. megaterium</i> (Cm ^r); mit 1.1 kb Fragment von pBM100	Vary, persönliche Gabe

2.2.3. Plasmidkonstruktion

2.2.3.1. Plasmide für Promotor-*gfp* Reporterkonstrukte

Als Ausgangsplasmid für die Untersuchung der Promotoraktivität der verschiedenen Kompetenz-assoziierten Gene diente das Plasmid pDF*gfp*. Dieses basiert auf dem Plasmid pYZ5 und enthält das *gfp* Gen. Die jeweiligen putativen Promotorfragmente der Kompetenz-assoziierten Gene wurden unmittelbar upstream des *gfp* kloniert. Als Promotorregion wurden die gesamten upstream-Bereiche der jeweiligen Gene definiert, da keine weiteren Informationen über Bindestellen oder den Aufbau der Promotoren verfügbar waren. Diese wurden aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 mittels PCR amplifiziert und entsprechend kloniert.

Die klonierten Promotorfragmente der Gene/Operons, verwendete Primer, Restriktionsenzyme und entsprechende Plasmidnamen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Erstellte Plasmide mit Promotor-*gfp* Fusion.

Promotor-fragment von:	Plasmid	Primer (forward/reverse)	Restriktionsenzyme (upstream/downstream)
<i>comG</i>	pTKBm06	primerTK13_PcomG fw	SpeI
		primerTK14_PcomG rev	KpnI
<i>comE</i>	pTKBm17	primerTK64fw PcomE+gfp fw	KpnI
		primerTK65rev PcomE+gfp rev	SpeI
<i>comF</i>	pTKBm18	primerTK66fw PcomF+gfp fw	KpnI
		primerTK67rev PcomF+gfp rev	SpeI
<i>ssbB</i>	pTKBm16	primerTK68fw PssbB+gfp fw	KpnI
		primerTK69rev PssbB+gfp rev	SpeI
<i>comK</i>	pTKBm05	primerTK11_PcomK-nah fw	XbaI
		primerTK12_PcomK-nah rev	SpeI

2.2.3.2. Plasmid für induzierbares *luxCDABE*-System

Um zu überprüfen, ob sich das *luxCDABE*-System als Reporter in *B. megaterium* eignet, wurde das *luxCDABE*-Operon in das Plasmid p3STOP1623hp downstream des Xylose induzierbaren Promotors kloniert. Das *luxCDABE* Operon wurde aus dem Plasmid pFU36 (GenBank: JF796081.1; (Uliczka *et al.*, 2011)) über die Schnittstellen BamHI (upstream) und EagI (downstream) herausgeschnitten und in p3STOP1623hp kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde als pTKBm08 bezeichnet.

2.2.3.3. Plasmide für Promotor-*luxCDABE* Reporterkonstrukte

Als Ausgangsplasmid für die Untersuchung der Promotoraktivität der verschiedenen Kompetenz-assoziierten Gene mittels Lumineszenz diente das Plasmid pTKBm06 (2.2.3.1). Dieses enthält das putative Promotorfragment des Operons *comG* upstream von *gfp*. In dieses wurden über gerichtete Mutagenese (2.5.11) zwei neue Restriktionsschnittstellen eingebracht. Es wurde eine Sall Schnittstelle 6 bp upstream des *gfp* mit dem Oligonukleotidpaar „primerTK35fw_Sall_Quikchange_pTKBm06“ / „primerTK36rev_Sall_Quikchange_pTKBm06“ (ergibt das Plasmid pTKBm06/2) und ein NotI Schnittstelle 34 bp upstream des Stopcodons von *gfp* mit dem Oligonukleotidpaar „primerTK37fw_NotI_Quikchange_pTKBm06“ / „primerTK38rev_NotI_Quikchange_pTKBm06“ eingefügt (Tab. 2.10). Das so erhaltene Plasmid wurde als pTKBm09 bezeichnet. Das *gfp* Gen wurde über die eingefügten Schnittstellen ausgeschnitten und durch das *luxCDABE* Operon (aus dem Plasmid pFU36; GenBank: JF796081.1; Uliczka *et al.*, 2011) so ersetzt, dass die native Ribosomenbindestelle (RBS) des *luxCDABE*-Operons mit eingefügt wurde. Das erhaltene Plasmid wurde als pTKBm10 bezeichnet. Die putativen Promotorfragmente der übrigen Kompetenz-assoziierten Gene wurden jeweils über BamHI (5'-Primer) und Sall (3'-Primer) upstream des *luxCDABE*-Operons in pTKBm10 kloniert. Das in dem Plasmid enthaltene putative Promotorfragment des *comG*-Operons wurde dabei jeweils gegen ein anderes Promotorfragment ausgetauscht. Die klonierten Promotorfragmente der Gene/Operons, verwendete Primer, Restriktionsenzyme und entsprechende Plasmidnamen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Erstellte Plasmide mit Promotor-*luxCDABE* Fusion.

Promotor-fragment von:	Plasmid	Primer (forward/reverse)	Restriktionsenzyme (upstream/downstream)
<i>comG</i>	pTKBm10	keine Primer, (<i>luxCDABE</i> aus pTKBm08 subkloniert)	Sall NotI
<i>comE</i>	pTKBm14	primerTK56fw_PcomE_lux-pTKBm10 primerTK57fw_PcomE_lux-pTKBm10	BamHI Sall
<i>comF</i>	pTKBm15	primerTK58fw_PcomF_lux-pTKBm10 primerTK59rev_PcomF_lux-pTKBm10	BamHI Sall
<i>ssbB</i>	pTKBm12	primerTK52fw_PssbB_lux-pTKBm10 primerTK53rev_PssbB_lux-pTKBm10	BamHI Sall
<i>comK</i>	pTKBm13	primerTK54fw_PcomK_lux-pTKBm10 primerTK55rev_PcomK_lux-pTKBm10	BamHI Sall
Kein Promotorfragment (Negativkontrolle)	pTKBm11	-	pTKBm10 mit BamHI und Sall geschnitten → blunt ends erzeugt → ligiert

2.2.3.4. Plasmide für Signalpeptid-Analyse

Als Ausgangsplasmid für die Untersuchung der verschiedenen Signalpeptide diente das Plasmid p3STOP1623hp. In dieses wurden eine zusätzliche „multiple cloning site“ (MCS 2) und ein His-Tag (6x Histidin) eingefügt. Dazu wurde das 67 bp Oligonukleotidpaar „oligo_fw_MCS+His-Tag_in_p3STOP1623hp“ / „oligo_rev_MCS+His-Tag_in_p3STOP1623hp“ über Agel eingebracht, wobei die ursprüngliche Agel Schnittstelle entfernt wurde (Tabelle 2.7). Die zusätzliche MCS enthält Schnittstellen für: KasI, MluI, AvrII, NotI, NheI und Agel. In downstream-Richtung folgen der His-Tag und ein Stopcodon (TAA). In das so erhaltene Plasmid p3STOP1623hp-MCS-HIS wurde das *amyE* Gen aus *B. subtilis* 168 (GenBank: CAB12098.2) kloniert. Dieses Gen codiert für eine α -Amylase und wurde mit den Primern „primerTK79rev_amyE_Bsubt_pTKSP0“ und „primerTK80fw_amyE_Bsubt_ohne SP_pTKSP0“ aus genomischer DNA von *B. subtilis* 168 mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen NgoMIV (upstream) und Agel (downstream) eingebracht (Tabelle 2.11). Mit den gewählten Primern wurde das native Signalpeptid von *amyE* nicht mit amplifiziert. Das so erhaltene Plasmid pTKSP α myE0 diente als Ausgangsplasmid für die Klonierung der verschiedenen Signalpeptid-Sequenzen sowie als Negativkontrolle für die Amylaseaktivität (Tab. 2.8). Die einzelnen Signalpeptid-Sequenzen wurden mit den entsprechenden Primern (siehe Anhang, Tab. 7.1) aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen BsrGI (upstream) und NgoMIV (downstream) in pTKSP α myE0 kloniert. Zusätzlich wurde das Signalpeptid der extrazellulären Esterase LipA (aus *B. megaterium* ATCC 9885) entsprechend den anderen Signalpeptiden kloniert. Die Signalpeptid-Sequenz wurde mit den Primern „primerTK83fw_LipA_SP-Testsystem“ und „primerTK84rev_LipA_SP-Testsystem“ aus Plasmid-DNA von pEJBmD1.3scFv amplifiziert, in dem das Signalpeptid für *B. megaterium* Codon-optimiert vorliegt (Jordan *et al.*, 2007).

Tabelle 2.7: Oligonukleotide zum Einfügen des MCS2-HIS-Tag-Stopcodon Fragments in p3STOP1623hp. Kursiv: Restriktionsschnittstelle; Großbuchstaben: Stopcodon; Fett: Agel-Überhang; Grau hinterlegt: 6x HIS-Tag

Name	Sequenz (5'→3')
oligo_fw_MCS+His-Tag_in_p3STOP1623hp	ccgg cgccgtacgcgtacctaggagcggccgcgctagca accggt catcaccatcac catcacTAA
oligo_rev_MCS+His-Tag_in_p3STOP1623hp	ccgga TTAgatgatggtgatggtgatg accggt gctagcgcggccgctcctaggtacg cgtacggcg

Tabelle 2.8. Erstellte Plasmide für das Screening von Signalpeptiden. Alle aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit erstellt.

Plasmidname	Proteinbezeichnung	GenBank ID
pTKSPamyE0	ohne Signalpeptid (Negativkontrolle)	-
pTKSPlipAamyE	Extrazelluläre Esterase LipA	CAD23620.1
pTKSPamyE1	conserved hypothetical protein	ADF39554.1
pTKSPamyE2	conserved hypothetical protein	ADF39788.1
pTKSPamyE3	putative peptidoglycan binding domain protein	ADF38755.1
pTKSPamyE4	putative protease, NlpC/P60 family	ADF40390.1
pTKSPamyE5	putative lipoprotein	ADF39262.1
pTKSPamyE6	sulfur-containing amino acid ABC transporter	ADF38874.1
pTKSPamyE8	putative lipoprotein YlaJ	ADF38206.1
pTKSPamyE9	hypothetical protein BMD_2542	ADF39387.1
pTKSPamyE10	Beta-amylase	ADF37268.1
pTKSPamyE11	conserved hypothetical protein	ADF37202.1
pTKSPamyE12	spore germination protein GerD	ADF37113.1
pTKSPamyE13	putative ABC transporter, substrate-binding protein	ADF39217.1
pTKSPamyE14	conserved hypothetical protein	ADF37265.1
pTKSPamyE15	levansucrase	ADF38395.1
pTKSPamyE16	peptidase, M23/M37 family	ADF41182.1
pTKSPamyE17	polysaccharide deacetylase	ADF38797.1
pTKSPamyE18	putative lipoprotein	ADF40084.1
pTKSPamyE19	hypothetical protein BMD_3197	ADF40037.1
pTKSPamyE20	pullulanase, type I	ADF38846.1
pTKSPamyE21	conserved hypothetical protein	ADF37472.1
pTKSPamyE22	hypothetical protein BMD_1921	ADF38774.1
pTKSPamyE24	hypothetical protein BMD_3923	ADF40755.1
pTKSPamyE26	spore cortex-lytic enzyme	ADF40060.1
pTKSPamyE27	conserved hypothetical protein	ADF39852.1
pTKSPamyE28	conserved hypothetical protein	ADF40379.1
pTKSPamyE29	conserved hypothetical protein	ADF40620.1
pTKSPamyE30	putative lipoprotein	ADF38943.1
pTKSPamyE31	putative oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein	ADF39709.1
pTKSPamyE32	putative ferrichrome ABC transporter, ferrichrome-binding protein	ADF40056.1
pTKSPamyE33	conserved hypothetical protein	ADF37687.1
pTKSPamyE35	ferrichrome import ABC transporter	ADF38368.1
pTKSPamyE36	sporulation lipoprotein, YhcN/YlaJ family	ADF38262.1
pTKSPamyE37	putative lipoprotein	ADF40339.1
pTKSPamyE39	cytochrome c-551	ADF41878.1
pTKSPamyE42	hypothetical protein BMD_1675	ADF38531.1
pTKSPamyE43	methyl-accepting chemotaxis protein	ADF39301.1
pTKSPamyE44	bacterial SH3 domain protein	ADF40325.1
pTKSPamyE45	transcription regulator domain protein	ADF39988.1
pTKSPamyE47	penicillin-binding protein	ADF41520.1
pTKSPamyE48	spore germination protein GerA	ADF38064.1

2.3. Kulturmedien und Zusätze

2.3.1. Vollmedium für *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium*

Falls nicht anders angegeben, wurden *E. coli* und *B. megaterium* Kulturen in LB-Medium kultiviert (Sambrook und Russell, 2001). Für Festmedien wurde zusätzlich 15 g/l Agar-Agar hinzugegeben.

LB-Medium (Lysogeny-Broth bzw. Luria-Bertani Broth)

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Schaeffers Sporulationsmedium (Schaeffer *et al.*, 1965)

Bacto Nutrient Broth	1,6 % (w/v)
KCl	0,1 % (w/v)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,025 % (w/v)
pH mit NaOH auf 7,0 einstellen	

2.3.2. Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden als Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und bei den vom Hersteller vorgeschriebenen Bedingungen gelagert. Sie wurden unter sterilen Bedingungen zu autoklaviertem und abgekühltem Medium zugegeben (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Verwendete Medienzusätze.

Medienzusatz	Bakterienstamm	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	<i>E. coli</i>	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	<i>B. megaterium</i> / <i>E. coli</i>	34 mg/ml in 70% (v/v) EtOH	2,5 µg/ml oder 4,5 µg/ml (<i>B. megaterium</i>); 34 µg/ml (<i>E. coli</i>)
Tetrazyklin	<i>B. megaterium</i>	5 mg/ml in 70% (v/v) EtOH	10 µg/ml
Xylose	<i>B. megaterium</i>	50% (w/v)	0,5% (w/v)
IPTG	<i>E. coli</i>	1 M in dH ₂ O	0,3 – 1 mM

2.4. Mikrobiologische Techniken

2.4.1. Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters: 0,2 µm).

2.4.2. Plattenkulturen von Bakterien

Für Plattenkulturen von Bakterien wurde aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse etwas Zellmaterial entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Diese enthielt bei Bedarf entsprechende Antibiotika-Zusätze. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C kultiviert und mit Parafilm abgedichtet für einige Tage bei 4°C gelagert.

2.4.3. Flüssigkulturen von *Escherichia coli*

Für Flüssigkulturen von *E. coli* wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Das Medium enthielt bei Bedarf das entsprechende Antibiotikum. Die Kultivierung erfolgte entweder in Reagenzgläsern oder Schikanekolben und erfolgte standardmäßig bei 37°C und 200 rpm über Nacht. Das Kulturvolumen und die Kultivierungsdauer variierten je nach Anwendung.

2.4.4. Flüssigkulturen von *Bacillus megaterium*

Für Vorkulturen von *B. megaterium* wurde 20 ml LB-Medium in einem 100 ml Schikanekolben mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Das Medium enthielt bei Bedarf ein entsprechendes Antibiotikum. Die Kultivierung erfolgte bei 100 rpm und 37°C über Nacht im Wasserbadschüttler. Die Hauptkulturen wurden mit einem Verhältnis von 1:50 oder 1:100 aus den Vorkulturen angeimpft. Das Kulturvolumen betrug entweder 50 ml oder 100 ml LB-Medium in entsprechend 300 ml oder 500 ml Schikanekolben. Das Medium enthielt bei Bedarf ein entsprechendes Antibiotikum. Die Kultivierung erfolgte bei 250 rpm und 37°C für die jeweils benötigte Dauer im Wasserbadschüttler.

2.4.5. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Flüssigkultur wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Bei einer $OD_{578nm} > 1$ wurden entsprechende Verdünnungen erstellt und vermessen. Eine OD_{578nm} von 1 entspricht bei

E. coli einer Zellzahl von $\sim 1 \times 10^9$ Zellen/ml (Näveke und Tepper, 1979) und bei *B. megaterium* $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml (Ravinskaya, 2011).

2.4.6. Lagerung von Bakterien

Die kurzfristige Lagerung von Bakterien erfolgte auf LB-Agar-Platten bei 4°C. Für die längerfristige Lagerung wurden Glycerinstocks der jeweiligen Kulturen verwendet. Hierzu wurden 650 µl einer Übernachtskultur mit 350 µl 87% (v/v) Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C gelagert.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Herstellung und Transformation CaCl_2 -kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Präparation der Zellen

Für die Präparation CaCl_2 -kompetenter *E. coli* Zellen wurde ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus dieser Kultur 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C und 250 rpm bis zu einer $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD wurde die Kultur in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, für 10 min auf Eis stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl_2 / 10% Glycerin Lösung resuspendiert. Die Falcons wurden für 15 min auf Eis gelagert und wieder für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Danach wurde erneut der komplette Überstand abgenommen, die Zellen in 1 ml 100 mM CaCl_2 / 10% Glycerin Lösung resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension zu 104 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die erhaltenen Aliquots wurden entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Transformation der Zellen

Die Transformation der CaCl_2 -kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden zu 50 µl der aufgetauten Zellsuspension entweder 1 µl (100 ng/µl) Plasmid oder 5 µl Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und für 20 - 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock durch Inkubation bei 42°C für 45 s, gefolgt von einer

Inkubation auf Eis für 2 min. Zu den Zellen wurde 1 ml LB-Medium gegeben und für 1 h bei 37°C und 800 rpm im Thermoblock inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Lösungen:

Resuspensionslösung

CaCl ₂	100,0	mM
Glycerin	10,0	% (v/v)

2.5.2. Herstellung und Transformation von *Bacillus megaterium*-Protoplasten

Präparation der Zellen

Für die Herstellung von *B. megaterium* Protoplasten wurde zunächst 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Schikanekolben im Verhältnis 1:50 aus einer *B. megaterium* Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm in einem Wasserbadschüttler kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{578nm} von 1 wurde die Kultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml frisch hergestelltem SMMP-Medium resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Protoplastierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µl frisch hergestellter steriler Lysozym-Lösung (~1 mg/ml Lysozym in SMMP) und Inkubation für ~30 min bei 37°C und leichtem Schwenken der Suspension. Die Bildung der Protoplasten (kugelförmige Zellen) wurde mikroskopisch überprüft. Nach erfolgreicher Protoplastierung wurden die Zellsuspension für 10 min bei 2600 rpm und RT zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus), der Überstand vorsichtig abgenommen und die sedimentierten Zellen vorsichtig in 5 ml SMMP-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde erneut für 10 min bei 2600 rpm und RT zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus), der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen wieder in 5 ml SMMP-Medium resuspendiert. Zu dem gesamten Ansatz wurde 750 µl 87% (v/v) Glycerin gegeben, vorsichtig gemischt und zu 500 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die erhaltenen Aliquots wurden entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Transformation der Zellen

Auf Grund des Fehlens der stabilisierenden Zellwand wurden im Folgenden die Protoplasten mit großer Vorsicht behandelt, dabei starkes Schütteln oder kräftiges Pipettieren vermieden. Für die Transformation der *B. megaterium* Protoplasten wurden 1 - 5 µg des gewünschten, mittels QIAGEN-Kit gereinigten Plasmids in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und ein Aliquot (500 µl) der Protoplasten hinzugegeben. Der Ansatz wurde zu 1,5 ml PEG-P in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, vorsichtig gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 ml SMMP-Medium zugesetzt, wieder vorsichtig gemischt und für 10 min bei 2600 rpm und RT zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, die sedimentierten Zellen (kaum sichtbar) in 500 µl SMMP-Medium aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für bei 30°C für 45 min ohne Schütteln und dann weitere 45 min bei 300 rpm in einem Thermoblock inkubiert. Die komplette Zellsuspension wurde dann zu 2,5 ml frisch hergestelltem CR5-Topagar in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, vorsichtig gemischt und umgehend auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum gegossen. Nach Verfestigung des CR5-Topagars wurden die Platten bei 30°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag auf Kolonien überprüft. Je drei erhaltene Kolonien wurden auf neue LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

Lösungen:2 × AB3 (Antibiotic Medium No. 3)

AB3 (von Difco)	35,0 g/l
autoklavieren	

2 × SMM (in der angegebenen Reihenfolge lösen)

Maleinsäure	40,0 mM
NaOH	80,0 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	40,0 mM
Saccharose	1,0 M
sterilfiltrieren	

1 x SMMP

2 × AB3	1,0 V
2 × SMM	1,0 V

PEG-P

PEG-6000 in 1 x SMM	40,0	% (w/v)
autoklavieren		

Lösung A

Saccharose	602,0	mM
MOPS	58,0	mM
NaOH	30,0	mM
pH auf 7.3 mit NaOH einstellen		
sterilfiltrieren		

Lösung B

Agar	14,04	g/l
Casamino-Acids	700,00	mg/l
Hefe-Extrakt	35,09	g/l
autoklavieren		

8 x CR5-Salze

K ₂ SO ₄	11,5	mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	393,5	mM
KH ₂ PO ₄	2,9	mM
CaCl ₂	158,6	mM
autoklavieren		

CR5-Topagar (2,5 ml)

Lösung A	1,25	ml
Lösung B	713,00	µl
8x CR5-Salze	288,00	µl
12 % Prolin	125,00	µl
20 % Glucose	125,00	µl

2.5.3. Zwei-Schritt Transformationsprotokoll zur natürlichen Transformation von *Bacillus megaterium*

Die Transformation verschiedener *B. megaterium* Stämme mittels natürlicher Kompetenz erfolgte nach dem Zwei-Schritt Transformationsprotokoll für natürlich kompetente *B. subtilis* Zellen (Harwood und Cutting, 1991).

Präparation der Zellen

Zur Herstellung natürlich kompetenter *B. megaterium* Zellen wurden die gewünschten Stämme zunächst aus einem Glycerin-Stock auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von diesen Platten wurden 20 ml frisch hergestelltes SpC-Medium in einem 100 ml Schikanekolben angeimpft. Dabei wurde so viel Zellmaterial von der Platte eingesetzt, dass zu Beginn der Kultivierung eine OD_{578nm} von ~0,5 vorlag. Anschließend wurde die Kultur bei 37°C und 250 rpm in einem Wasserbadschüttler kultiviert. Beim Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde 1 ml der Kultur entnommen und damit 100 ml SpII-Medium in einem 300 ml Schikanekolben angeimpft. Diese Hauptkultur wurde für 90 min bei 37°C und 140 rpm weiter im Wasserbadschüttler kultiviert. Anschließend wurde die gesamte Kultur in 50 ml Falcons bei 4000 rpm und RT für 20 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Der Überstand wurde in neue 50 ml Falcons überführt und die sedimentierten Zellen in je 4,5 ml des zuvor abgenommenen Überstands resuspendiert. Zu jedem Falcon (4,5 ml Überstand + Zellen aus 50 ml Kultur) wurden 500 µl 87% (v/v) Glycerin gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde zu 500 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und umgehend für die Transformation eingesetzt oder bei - 80°C gelagert.

Transformation der Zellen

Für die Transformation wurde ein Aliquot pro Ansatz zügig bei 37°C im Thermoblock aufgetaut oder die frisch präparierten Zellen verwendet. Zu dem Aliquot wurde umgehend 500 µl (1 Volumen) SpII+EGTA hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden DNA (pBC16-1: ~500 ng). Die Ansätze wurden dann bei 37°C und 300 rpm für 30 min im Thermoblock inkubiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (pBC16-1: 10 µg/ml Tetrazyklin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag auf Kolonien überprüft.

Lösungen:T-Base

(NH ₄) ₂ SO ₄	317,84 mM
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	80,19 mM
KH ₂ PO ₄	44,09 mM
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	3,40 mM
autoklavieren	

SpC (frisch herstellen)

T-Base	20,0 ml
50% (w/v) Glukose oder Fruktose	200 µl
1,2% (w/v) MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300 µl
10% (w/v) Bacto yeast extract	400 µl
1% (w/v) Casamino acids	500 µl

SpII (frisch herstellen)

T-Base	200,0 ml
50% (w/v) Glucose oder Fructose	2,0 ml
1,2% (w/v) MgSO ₄ x 7 H ₂ O	14,0 ml
1% (w/v) Casamino acids	2,0 ml
10% (w/v) Bacto yeast extract	2,0 ml
100 mM CaCl ₂	1,0 ml

SpII + EGTA

SpII (ohne CaCl ₂)	200,0 ml
100 mM EGTA (pH 8,0)	4,0 ml
500 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotieren und bei -20°C lagern	

2.5.4. Präparation genomischer DNA aus *Bacillus megaterium*

Für die Präparation von genomischer DNA aus *B. megaterium* wurde eine Einzelkolonie in 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Schikanekolben über Nacht bei 37°C und 250 rpm kultiviert, die Kultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4°C und 5000 rpm für 20 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 10 ml SET-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe

einer Spatelspitze Lysozym und Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln für 1 - 2 h protoplastiert, so dass bei mikroskopischer Kontrolle ausschließlich Protoplasten zu sehen waren. Anschließend wurde zu der Zellsuspension eine Spatelspitze Proteinase K (in SET-Puffer gelöst) gegeben und bei 56°C für 1 - 2 h inkubiert, so dass die Suspension schleimig erschien. Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 24:1:1) wurde 3 min kräftig gevortext und bei 4°C und 5000 rpm für 30 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Die erhaltene Oberphase wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, erneut mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 24:1:1) versetzt, 1 min kräftig gevortext und bei 4°C und 5000 rpm für 30 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Die Oberphase wurde wieder in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und langsam 0,7 Volumen Isopropanol (RT) hinzugegeben. Hierbei fiel die genomische DNA als weißliches Knäuel aus, wurde mit einer zum Haken gebogenen Pasteurpipette entnommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das DNA-Knäuel wurde in 5 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 2 mg DNase-freier RNase bei 37°C für 1 h oder über Nacht inkubiert. Zu dem Ansatz wurde darauf 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 24:1) gegeben, vorsichtig geschüttelt und bei 4°C und 5000 rpm für 30 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Die Oberphase wurde wieder wie zuvor beschrieben überführt, die DNA mit Isopropanol gefällt, in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 2x mit 70% (v/v) EtOH_{reinst} bei 37°C gewaschen. Die präzipitierte DNA wurde dann an der Luft getrocknet, wobei darauf geachtet wurde, dass die DNA nicht vollständig austrocknet, abschließend in 5 ml H₂O_{deion} aufgenommen, über Nacht bis zu ein paar Tagen bei RT gelöst und dann bei 4°C gelagert.

Lösungen:

SET-Puffer

Saccharose	20,0	% (w/v)
EDTA (pH 8,0)	50,0	mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50,0	mM

2.5.5. Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation von hoch reiner Plasmid-DNA, die für die Protoplastentransformation von *B. megaterium*, für Klonierungen oder zur Sequenzierung verwendet wurde, erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Abweichend davon wurde die Säule vor der Elution im Thermoblock für 3 min bei 70°C getrocknet. Zur Elution der DNA wurde H₂O_{deion} verwendet.

Die Präparation von Plasmid-DNA für den Einsatz in einem Testverdau erfolgte nach einem anderen Protokoll. Dazu wurden 6 ml einer *E. coli* Übernachtskultur, die das gewünscht Plasmid trägt, komplett in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß geerntet (Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm (Minispin, Eppendorf), zellfreien Überstand jeweils verwerfen). Die sedimentierten Zellen wurden in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer, mehrfaches Invertieren und einer Inkubation von 2 min. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Suspension durch Zugabe von 300 µl P3-Puffer und sofortigem Invertieren. Die Proben wurden dann bei 13000 rpm für mindesten 30 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf) und der klare Überstand komplett (~800 µl) in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden 600 µl Isopropanol hinzugegeben, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren, und für mindestens 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Der Überstand wurde erneut verworfen, die präzipitierte DNA in 400 µl 70% (v/v) EtOH resuspendiert und erneut für mindestens 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Der Überstand wurde abgenommen und der Rest durch Trocknen bei 70°C im Thermoblock verdampft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA nicht zu sehr austrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O_{deion} bei 37°C für 10 min gelöst und entweder gleich für weitere Anwendungen eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Lösungen:

P1-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	50,0	mM
EDTA (pH 8,0)	10,0	mM
RNase A	100,0	µg/ml

P2-Puffer

NaOH	200,0	mM
SDS	1,0	% (w/v)

P3-Puffer

Kaliumacetat (pH 5,5)	3,0	M
-----------------------	-----	---

2.5.6. Präparation von Plasmid-DNA aus *Bacillus megaterium*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *B. megaterium* erfolgte in Anlehnung an das in Abschnitt 2.5.5 beschriebene Protokoll für *E. coli*. Abweichend davon betrug das Volumen der Übernachtskultur 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem 300 ml Schikanekolben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 250 rpm über Nacht in einem Wasserbadschüttler. Die Kultur wurde durch Zentrifugieren in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für 10 min bei 4000 rpm und RT geerntet (Megafuge 1.0R, Heraeus), der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 3 ml TE(H)-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 300 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und im Folgenden wie für *E. coli* beschrieben behandelt. Abweichend davon betrug das Volumen der Puffer P2 und P3 je 350 µl.

Lösungen:

TE(H)-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	150,0	mM
EDTA (pH 8,0)	20,0	mM
Lysozym	30,0	µg/ml

P2-Puffer

NaOH	200,0	mM
SDS	1,0	% (w/v)

P3-Puffer

Kaliumacetat (pH 5,5)	3,0	M
-----------------------	-----	---

2.5.7. Präparation von RNA aus *Bacillus megaterium* für Microarray-Experimente

Die zu untersuchenden *B. megaterium* Stämme wurden bei den entsprechenden Bedingungen bis zur gewünschten OD_{578nm} in je vier biologischen Replikaten kultiviert und das benötigte Volumen berechnet, um 25 OD-Äquivalente zu erhalten. Das berechnete Kulturvolumen wurde zu 25 ml eiskaltem Killing-Puffer in einem 50 ml Falcon Röhrchen gegeben und über Kopf gemischt. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 rpm für 3 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus), der Überstand, bis auf ~1 ml Überstand, verworfen und die sedimentierten Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Zellsuspension wurde

in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 4°C und 13000 rpm für 1 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf), der Überstand komplett abgenommen und die sedimentierten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf die gefrorenen sedimentierten Zellen wurden 600 mg Glasperlen (Firma Worf, Durchmesser 38 - 45 µm) und 1 ml Lysispuffer gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Fastprep-Gerät (MP Biomedicals) 2x für 60 s bei 6,5 m/s. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 13000 rpm für 1 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf), der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Acid-Phenol Lösung (Aqua-Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 50:48:2) versetzt. Der Ansatz wurde direkt im Anschluss über Kopf geschüttelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Zellsuspension wurde im Weiteren unter wiederholtem Schütteln und Entgasen aufgetaut und bei 4°C und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Die obere Phase (~800 µl) wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml vorgelegtem Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 48:2) überführt, über Kopf geschüttelt und erneut bei 4°C und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Hiervon wurde die obere Phase (~700 µl) in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 70 µl (1/10 Volumen) 3 M Na-Acetat (pH 5,2) überführt, gevortext und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Die Probe wurde im Anschluss erneut gevortext und für mindestens 1 h bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Suspension bei 4°C und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert (Minispin, Eppendorf), der Überstand komplett abgenommen und die sedimentierte RNA für maximal 5 min an der Luft angetrocknet. Die getrocknete RNA wurde in 180 µl RNA-Storage-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 50°C gelöst. Der Verdau der verbliebenen DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl 10x DNase-Puffer gefolgt von 2 µl DNase (2 U/µl) und einer Inkubation bei 37°C für 30 min. Die RNA mit dem RNA Reinigungskit „innuPrep RNA Mini Kit“ (Analytik Jena AG, Jena) nach Protokoll 3 (RNA extraction from bacterial cells) beginnenden ab Schritt Nr. 6 gereinigt. Für die weitere Analyse der RNA mittels Nanodrop und Bioanalyzer wurde 4 µl der RNA abgenommen und der Rest bei -80°C gelagert.

Lösungen:

Killing-Puffer

Tris-HCl (pH 7,5)	20,0 mM
-------------------	---------

MgCl ₂	5,0 mM
-------------------	--------

autoklavieren, danach hinzu pipettieren:

NaN ₃	20,0 mM
------------------	---------

zu je 25 ml in sterile 50 ml Falcon Röhrchen abfüllen und bei -20°C lagern

Lysis-Puffer

Guanidinthiocyanat	4,00	M
Na-Acetat pH 5,2	24,96	mM
N-lauroylsarcosin	0,50	%

RNA-Storage-Buffer

Na ₂ PO ₄ (pH 6,5)	20,0	mM
EDTA (pH 8,0)	1,0	mM
2x autoklavieren		

10x DNase-Puffer

Na-Acetat pH 4,5	200,0	mM
MgCl ₂	100,0	mM
NaCl	100,0	mM
2x autoklavieren		

2.5.8. Prozessierung von RNA für Microarray

Zunächst wurde die Konzentration und Integrität der zuvor isolierten RNA kontrolliert. Dafür wurden zum einen 2 µl der RNA mit dem Nanodrop vermessen (Nanodrop Einstellungen: Nucleic acid, ssRNA, ng/µl). Zum anderen wurde 1 µl RNA (50 - 500 ng/µl) zur Bestimmung der Qualität mittels Bioanalyzer (Nano-Kit) vermessen, wobei bezüglich der Integrität der RNA eine RIN >8,5 (RNA integrity number) erforderlich ist.

Labeln der RNA

Die Markierung der RNA mit entsprechendem Farbstoff erfolgt mit dem „USL Fluorescent labeling Kit for Agilent Arrays (with Cy3 and Cy5)“ (Kreatech Diagnostics; Amsterdam, Niederlande). Hierbei wurde die RNA aus *B. megaterium* DSM-319 mit Cy3 und die aus *B. megaterium* MS-941 mit Cy5 markiert. In ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1 µg gelöste RNA gegeben und das Volumen mit RNase freiem Wasser auf 17 µl aufgefüllt. Zu dem Ansatz wurden 2 µl 10x labeling solution sowie 1 µl Cy-ULS-labeling reagent (Cy3 für DSM-319; Cy5 für MS-941) gegeben und bei 85°C für 15 min lichtgeschützt im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe kurz auf Eis gekühlt, anzentrifugiert und komplett auf die zuvor präparierte und mit 300 µl RNase freiem Wasser gewaschene KREApure Säule gegeben. Die gelabelte RNA wurde durch Zentrifugation (Minispin, Eppendorf) bei RT für 1

min und 13000 rpm eluiert und die Konzentration und die Farbstoff-Einbaurate mittels Nanodrop bestimmt (Nanodrop Einstellung: Microarray, RNA-40).

Fragmentierung der gelabelten RNA und Beladen der Array-slides

Die Fragmentierung und Hybridisierung der gelabelten RNA erfolgte nach Schritt 2 des „Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol“ (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen).

Für die Fragmentierung wurden je 300 ng der beiden mit Cy3 bzw. Cy5 gelabelten RNA Proben mit 5 µl 10x Blocking agent in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen auf 24 µl aufgefüllt. Die Proben wurden gemischt, anzentrifugiert und 1 µl 25x Fragmentierungs-Puffer zugegeben. Unmittelbar nach Zugabe des Puffers wurden die Proben bei 60°C für exakt 30 min inkubiert, sofort 25 µl 2x Hybridisierungspuffer HI-RPM zugegeben, durch Pipettieren gut gemischt und kurz auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm (Minispin, Eppendorf) wurden die Ansätze wieder kurz auf Eis gekühlt und ohne Verzögerung 40 µl der Probe luftblasenfrei auf ein 8x15K Gasket-slide aufgetragen. Der Array-slide wurde aufgelegt und bei 65°C und 10 rpm für 17 h im Microarray Hybridisierungssofen inkubiert.

Zum Waschen und Auslesen des Array-slides wurde der Array-slide im Waschpuffer 1 vom Gasket-slide gelöst, in Waschpuffer 1 gespült, in dem auf 37°C vorgewärmten Waschpuffer 2 für 1 min inkubiert und anschließend in den DNA-Microarray Scanner geladen und analysiert.

2.5.9. Scan von Microarrays

Das Scannen der Microarrays erfolgte mit dem *High-Resolution Microarray Scanner* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe der Software „Agilent Scan Control“ (Version 8.4.1; Agilent Technologies). Abschließend wurden die Daten mit der Software „Feature extraction“ (Version 10.7.3.1; Agilent Technologies) extrahiert.

2.5.10. Auswertung von Microarrays

Die Microarrays wurden mit Hilfe der Software „R“ durch Nutzung von „Bioconductor“ (Gentleman *et al.*, 2004; Yang und Paquet, 2005) prozessiert (Bunk, 2010; Borgmeier *et al.*, 2011). Das Einlesen der Daten basierte auf dem „marray-Package“, die Intensität der Proben und des Hintergrunds wurden mittels „*read.Agilent*“ Funktion gespeichert. Der Kontroll-Code der Agilent Microarray-Chips wurde zur Definition von Kontrollen und Artefakten adaptiert. Die Normalisierung wurde durch eine „Lowess“-Normalisierung vorgenommen. Jedem Gen wurde mittels „mean-“ und „median-summarization“ aus drei Sonden der logarithmische

„Foldchange“ (logFC) zugeordnet, wobei nur Gene berücksichtigt wurden, für die der p-value für jeden einzelne Sonde $< 0,01$ war. Als differentiell exprimierte Gene wurden jene angegeben, deren logFC $> \pm 0,8$ betrug.

2.5.11. Site-Directed Mutagenesis (QuikChange)

Der Austausch von einzelnen Basenpaaren auf einem Plasmid erfolgte mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) nach den Angaben des Herstellers, wobei abweichend davon für die Reaktion jeweils das halbe Volumen der angegebenen Komponenten eingesetzt wurde (1/2 Reaktion).

Bei der Reaktion diente das zu mutierende Plasmid als template und wurde mittels PCR amplifiziert. Die Basenaustausche wurden über entsprechende Primer eingefügt, die komplementär zu gegenüberliegenden Strängen des Plasmids waren und die gewünschten veränderten Basen enthielten. Für die PCR wurde eine PfuTurbo DNA Polymerase verwendet. Das ungewollte, als template eingesetzte Plasmid wurde mittels DpnI Verdau abgebaut. Das Enzym DpnI verdaut ausschließlich teilweise methylierte DNA, so dass das gewünschte PCR-Produkt nicht verdaut wurde. Anschließend wurden *E. coli* XL1-blue Zellen mit dem PCR-Produkt transformiert, wo die freien Einzelstrang-Enden der DNA durch Ligasen geschlossen wurden, in der Folge das zirkuläre Plasmid amplifiziert und wieder isoliert werden konnte.

Die verwendeten Primer wurden den Bedürfnissen entsprechend entworfen und von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Germany) bezogen.

Tabelle 2.10: Verwendete Oligonukleotide für „site-directed mutagenesis“. Kursiv: Restriktionsschnittstelle; Unterstrichen: Basenaustausche

Name	Sequenz (5'→3')
primerTK35fw_Sall_Quikchange_pTKBm06	gtgatgatcgatatgacct <u>aagtc</u> gacactagttcgaagatc
primerTK36rev_Sall_Quikchange_pTKBm06	gatcttcgaactagtgtc <u>gactt</u> aggtcatcacgatcatcac
primerTK37fw_NotI_Quikchange_pTKBm06	ccttctgagtttgtag <u>cgccg</u> ctgggattacac
primerTK38rev_NotI_Quikchange_pTKBm06	gtgtaatcccagc <u>ggccg</u> ctacaaactcaagaagg

2.5.12. DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Gewünschte DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden für jedes DNA-Fragment die entsprechenden Primer, bei Bedarf mit den passenden Restriktionsschnittstellen und benötigten zusätzlichen Basen, aus der Genomsequenz abgeleitet. Die Primer wurden von der Firma Biomers (biomers.net GmbH, Ulm) oder von Metabion (metabion GmbH, Planegg-Martinsried) bezogen. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

Die PCR wurde mit der Phusion DNA-Polymerase der Firma New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Volumen einer Reaktion betrug standardmäßig 20 µl.

Standardansatz für 1x PCR-Reaktion:

Komponente	20 µl Reaktion	Endkonzentration
H ₂ O _{deion}	add 20 µl	
5X Phusion HF oder GC Buffer	4 µl	1X
10 mM dNTPs	0.4 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	1 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,5 µM
Template DNA	variabel	< 250 ng
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl	1,0 U/20 µl PCR

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler des Modells Tpersonal der Firma Biometra (Biometra GmbH, Göttingen). Das PCR-Programm wurde entsprechend der Angaben für die Phusion DNA-Polymerase, mit einem auf 105°C vorgeheizten Deckel durchgeführt. Die Annealing-Temperatur für die Primer richtete sich nach den Angaben des Herstellers für die Phusion DNA-Polymerase und betrug in der Regel 50 - 60°C:

Standard Phusion PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	Funktion	
98 °C	30 s	Denaturierung	} 30x
98 °C	10 s	Denaturierung	
50 - 60 °C	20 s	Hybridisierung	
72 °C	30 s/kb	Elongation	
72 °C	10 min	Finale Elongation	
10 °C	∞	Lagerung	

Tabelle 2.11: Verwendete Primer für PCR. Restriktionsschnittstellen sind kursiv angegeben, zusätzlich eingefügte Basen sind unterstrichen angegeben.

Primername	Schnittstelle	Zielvektor	Erstelltes Plasmid/Funktion	Sequenz (5'→3')
primerTK11_PcomK-nah fw	XbaI	pDFBm8	pTKBm05 (<i>PcomK-gfp</i>)	atca <u>tctagag</u> taggt gacgcaattgcag
primerTK12_PcomK-nah rev	SpeI			atca <u>aactag</u> tgcacatca ttgtcatacatc
primerTK13_PcomG fw	SpeI	pDFBm8	pTKBm06 (<i>PcomG-gfp</i>)	atca <u>aactag</u> tgcacatt cggatcagcatc
primerTK14_PcomG rev	KpnI			atcaggtaccgacaa cagaagggatggatg
primerTK18_PcwIC rev	KpnI	-	EMSA PcwIC (forward Primer)	atcaggtaccgtgaac cttccttcaatc
primerTK27fw_PcwIC Trunc 1	XbaI	-	EMSA PcwIC (reverse Primer)	atca <u>tctagag</u> ctcgg atttttatgtc
primerTK30fw_PcwIC Trunc 4	XbaI	-	EMSA PcwIC Kontrollfragment (reverse Primer)	atca <u>tctagagg</u> acga accctctgtcc
primerTK33fw_comK_Bmeg für GST	EcoRI	pGEX-6P-1	pSWec3 (GST-ComK _{Bmeg})	atcaga <u>attcat</u> gaca aatgatgaaaagtac
primerTK34rev_comK_Bmeg für GST	XhoI			atcactcgagttatgcc aagacaaccggac
primerTK52fw_PssbB_lux-pTKBm10	BamHI	pTKBm10	pTKBm12 (<i>PssbB-luxCDABE</i>)	atcagga <u>tccc</u> atcgt accatttctatcg
primerTK53rev_PssbB_lux-pTKBm10	Sall			tgatg <u>tcgact</u> tagtta atcatagtctacc
primerTK54fw_PcomK_lux-pTKBm10	BamHI	pTKBm10	pTKBm13 (<i>PcomK-luxCDABE</i>)	atcagga <u>tccg</u> taggt gacgcaattgcag
primerTK55rev_PcomK_lux-pTKBm10	Sall			tgatg <u>tcgact</u> taacat ttgtcatacatctac
primerTK56fw_PcomE_lux-pTKBm10	BamHI	pTKBm10	pTKBm14 (<i>PcomE-luxCDABE</i>)	atcagga <u>tccc</u> ttctc agctgtatcagc
primerTK57fw_PcomE_lux-pTKBm10	Sall			tgatg <u>tcgact</u> taagtc aaattatacactcc
primerTK58fw_PcomF_lux-pTKBm10	BamHI	pTKBm10	pTKBm15 (<i>PcomF-luxCDABE</i>)	atcagga <u>tccg</u> ttctt gatgaggatgc
primerTK59rev_PcomF_lux-pTKBm10	Sall			tgatg <u>tcgact</u> taagc atatcttcattcc
primerTK64fw PcomE+gfp fw	KpnI	pTKBm06	pTKBm17 (<i>PcomE-gfp</i>)	atcagga <u>tccc</u> ttctc agctgtatcagc
primerTK65rev PcomE+gfp rev	SpeI			tgata <u>ctag</u> tagtcaa attatacactcc
primerTK66fw PcomF+gfp fw	KpnI	pTKBm06	pTKBm18 (<i>PcomF-gfp</i>)	atcagga <u>tccg</u> ttctt gatgaggatgc
primerTK67rev PcomF+gfp rev	SpeI			tgata <u>ctag</u> taagcat atcttcattcc
primerTK68fw PssbB+gfp fw	KpnI	pTKBm06	pTKBm16 (<i>PssbB-gfp</i>)	atcagga <u>tccc</u> atcgt accatttctatcg
primerTK69rev PssbB+gfp rev	SpeI			tgata <u>ctag</u> tgttaatc atagtctacc
primerTK79rev_amyE_Bsubt_pTKSP0	AgeI	pTKSP0	pTKSPamyE0 (<i>amyE</i> Testvektor ohne Signalpeptid)	atcata <u>accgg</u> tcaat ggggaagagaacc
primerTK80fw_amyE_Bsubt_ohne SP_pTKSP0	NgoMIV			atcatag <u>ccgg</u> cgaac acggcgaacaaatcg

2.5.13. Reinigung von PCR-Amplifikaten

Die Reinigung von PCR Amplifikaten mit einer Länge > 200 bp erfolgte mit dem PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Abweichend davon wurde die Säule vor der Elution im Thermoblock für 3 min bei 70°C getrocknet. Zur Elution der DNA wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ verwendet und für mindestens 10 min auf der Säule inkubiert.

Für DNA-Fragmente mit einer Länge von < 200 bp erfolgte die Reinigung unter der Verwendung des QIAEXII Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers (Protocol: Desalting and Concentrating DNA Solutions). Die Elution der DNA wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ in zwei Schritten durchgeführt.

2.5.14. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen; mittlerweile ThermoScientific; Nanodrop Einstellungen: Nucleic acid, dsDNA, ng/μl). Dabei erfolgt eine Anregung der zu messenden Probe (2 μl) bei 230 nm und die Messung der Absorption (A) bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Protein). Aus dem Absorptionswert für 260 nm kann die DNA-Konzentration bestimmt werden, wobei eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 μg/ml dsDNA entspricht. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm kann die Verunreinigung der DNA durch Proteine bestimmt werden. Dabei bedeutet ein Wert für $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8 - 2,0$ reine DNA. Kleinere Werte deuten auf Proteinverunreinigung hin.

Teilweise erfolgte ergänzend eine Abschätzung der DNA-Konzentration über ein Agarosegel. Dabei wurde die Intensität der zu gewünschten DNA-Bande mit einer Bande eines Mengenstandards mit bekannter DNA-Konzentration verglichen.

2.5.15. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden Agarosegele mit einer Agarose-Konzentration von 1 - 2 % in 1x TAE-Puffer verwendet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen von 6x Probenpuffer versetzt. Als Größen- und Mengenstandard zur Abschätzung der DNA-Probe wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung im Gel erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 90 - 120 V für 20 - 50 min. Sowohl die Wahl der Gelkonzentration als auch der Laufbedingungen waren abhängig von der Größe der erwarteten DNA-Fragmente. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend für 10 - 20 min in einem

Ethidiumbromid-Bad gefärbt, kurz in einem Wasserbad gespült und anschließend mit UV-Licht der Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation des Agarosegels erfolgte mittels einer in eine Geldokumentationsanlage integrierten Kamera mit entsprechender Software (DeVision G, Decon Science Tec).

Lösungen:

1x TAE-Puffer

Tris (pH 8,0)	40,0 mM
EDTA (pH 8,0)	1,0 mM

6x Probenpuffer

Bromphenolblau	350,0 µM
Xylen Cyanol FF	450,0 µM
Glycerin	60,0 % (v/v)

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	0,1 % (w/v)
----------------	-------------

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Der Marker enthielt die folgenden Fragmente (in Basenpaaren):

10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100.

2.5.16. Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

In dieser Arbeit verwendete DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (biomers.net GmbH; Ulm) bezogen. Um sie für die Klonierung einsetzen zu können, wurden diese zunächst an ihrem 5'-Ende phosphoryliert. Dies erfolgte mit der T4-Polynukleotidkinase (NEB; Ipswich, MA, USA). Dazu wurden 300 pmol des jeweiligen Oligonukleotids, 5 µl 10x T4 DNA Kinase Puffer, 10 U der T4-Polynukleotidkinase eingesetzt und das Volumen mit H₂O_{deion} auf 50 µl aufgefüllt. Die Phosphorylierung erfolgte bei 37°C für 30 min, gefolgt von einem Denaturierungsschritt bei 65°C für 20 min.

Für die Hybridisierung zweier phosphorylierter Oligonukleotide wurden beide Ansätze zusammengeführt, für 3 min bei 95°C denaturiert und für 1 min bei der berechneten

Annealing-Temperatur hybridisiert. Die Ansätze wurden weiter 1 min bei 55°C inkubiert und anschließend für die Ligation eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.19).

2.5.17. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA, USA). Der Verdau wurde den Angaben des Herstellers folgend in den entsprechenden Puffern bei 37°C zwischen 30 min und 14 h durchgeführt.

2.5.18. Reinigung von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten

Die Reinigung von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten mit einer Länge > 200 bp erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Extraktion mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden). Das DNA-Fragment wurde zunächst in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit dem Farbstoff Gelstar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza; Basel, Schweiz) für 30 - 60 min gefärbt, auf einem Blauschirm sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei zur Elution 30 µl H₂O_{deion} verwendet und mindestens 10 min auf der Säule inkubiert wurden.

Für DNA-Fragmente mit einer Länge von < 200 bp erfolgte die Reinigung ohne Agarosegel unter der Verwendung des QIAEXII Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden), nach den Angaben des Herstellers (Protocol: Desalting and Concentrating DNA Solutions). Die Elution der DNA wurde mit H₂O_{deion} in zwei Schritten durchgeführt.

2.5.19. Ligation von DNA

Die Ligation von zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (NEB; Ipswich, MA, USA). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem 10 µl Ansatz. Das Mengenverhältnis von Insert zu Vektor betrug standardmäßig 3:1. Die Inkubation wurde bei RT für 1 - 3h oder bei 17°C über Nacht durchgeführt, wobei die Inkubationszeit bei blunt-end länger als bei sticky-end Ligationen gewählt wurde.

2.5.20. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Dazu wurden je 20 µl der zu sequenzierenden DNA mit einer Konzentration von ~100 ng/µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen verschickt. Die zugehörigen Primer für

die Sequenzierreaktion wurden ebenfalls in einem Volumen von 20 µl und einer Konzentration von 10 pmol/µl in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen versandt.

Die Auswertung der gelieferten Sequenziererergebnisse wurde eigenständig mit den Programmen EditSeq, SeqMan (beide: DNASTar; Madsion, USA) und Vector NTI (Invitrogen; Carlsbad, USA) durchgeführt.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Expression rekombinanter Gene in *Bacillus megaterium*

Für die Produktion rekombinanter Proteine in *B. megaterium* wurden die jeweiligen Plasmidstämme wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei dem in dieser Arbeit verwendeten Xylose-induzierbaren Promotorsystem durch Zugabe von 0,5% (w/v) Xylose bei einer OD_{578nm} zwischen 0,3 - 0,4 zu der Kultur.

2.6.2. Rekombinante Produktion von ComK_{Bmeg} in *Escherichia coli*

Die rekombinante Produktion des Proteins ComK_{Bmeg} aus *B. megaterium* DSM-319 (ComK_{Bmeg}; GenBank: ADF37998.1) erfolgte in *E. coli* ER2523 oder *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Die Kultivierung erfolgte wie in 2.4.3 beschrieben mit einem Kulturvolumen von 500 ml in einem 1 L Schikanekolben. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von 0,3 - 1 mM IPTG bei einer OD_{578nm} von 0,5. Die Proteinproduktion erfolgte abhängig vom Protein für 2 - 6 h bei 17°C oder 37°C.

2.6.2.1. Zellernte, Zellaufschluss und Präparation des zellfreien Extraktes aus *Escherichia coli*

Zellernte *E. coli* ER2523-Kulturen

Die Kulturen wurde bei 5000 rpm und 4°C für 20 min in 1 L-Zentrifugenflaschen zentrifugiert (Avanti J-30I; Beckman Coulter), der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 25 ml Column-Buffer pro 1 L Kultur resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und über Nacht bei -20°C gelagert.

Zellernte *E. coli* BL21 (DE3)-Kulturen

Die Kulturen wurde bei 5000 rpm und 4°C für 15 min in 1 L-Zentrifugenflaschen zentrifugiert (Avanti J-30I; Beckman Coulter), der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 50 ml eiskaltem PBS-Puffer pro 1 L Kultur resuspendiert. Die Zellsuspension wurde

anschließend erneut bei 3000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet über Nacht bei -20°C gelagert. Zur weiteren Behandlung wurde das Zellpellet in 50 ml Puffer A resuspendiert.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid zugegeben. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde ein Ultraschallhomogenisator mit folgenden Einstellungen verwendet: 3 x 5 min; 2 min Pause zwischen jeder Ultraschallbehandlung; 50 % cycle; 70 % power. Das Lysat wurde dann bei 14000 rpm (Avanti J-E; Beckman Coulter) und 4°C für 40 min zentrifugiert und der erhaltene zellfreie Extrakt für die weitere Reinigung eingesetzt.

Lösungen:

Column-Buffer

NaCl	200,0	mM
Tris-HCl (pH 7,4)	20,0	mM
EDTA	1,0	mM
DTT	1,0	mM

PBS-Puffer

NaCl	140,0	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	10,0	mM
KH ₂ PO ₄	1,8	mM

Puffer A

Tris-HCl (pH 8,0)	50,0	mM
NaCl	150,0	mM
EDTA (pH 8,0)	1,0	mM
DTT	5,0	mM

2.6.3. Affinitäts- und Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von MBP-ComK_{Bmeg}

Das Fusionsprotein MBP-ComK_{Bmeg} wurde zunächst mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Hierbei diente das N-terminale MBP (Maltose binding protein) als Tag und ein Amylose-Resin (New England Biolabs) als Säulenmaterial. Das Amylose-Resin (4 ml Säulenvolumen) wurde in eine Säule geladen und mit 10 SV (Säulenvolumen) Column-Buffer gewaschen. Danach wurde der zellfreie Lysat aus dem Zellaufschluss auf die Säule gegeben und die Säule mit 10 SV Column-Buffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 5 SV einer 10 mM Maltose-Lösung. Das Eluat wurde zu 15 Fraktionen á 1 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die 4 Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt und mit einer VIVASPIN 4 Säule (Sartorius Stedim Biotech) bis auf 800 µl aufkonzentriert (4000 rpm, 4°C; Megafuge 1.0R, Heraeus). Anschließend wurde der MBP-Tag mittels Enterokinase (New England Biolabs) vom ComK-Protein abgeschnitten. Dazu wurde die Probe 2 Tage bei 4°C mit 10 pg Enterokinase pro µg gereinigtem Protein inkubiert. Anschließend wurde die Probe umgepuffert. Der Verdau wurde hierzu mit Säulenpuffer auf 2,5 ml aufgefüllt und auf eine Nap-25-Säule gegeben. Diese wurde zuvor mit 25 ml Säulenpuffer äquilibriert. Das Protein wurde dann mit 3,5 ml Säulenpuffer eluiert. Zur weiteren Reinigung des Proteins wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Zunächst wurde 1 ml Q-Sepahrose als Resin in eine Säule gegeben und mit 10 SV einer 1 M NaCl / 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) gefolgt von 20 SV Säulenpuffer gewaschen. Die Probe wurde im Anschluss auf die Säule gegeben und nach deren Durchlaufen mit 10 SV gewaschen. Die Elution erfolgte in steigender Konzentration mit jeweils 1 mL einer 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 und 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)-Lösung. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Lösungen für die Affinitätschromatographie:

Column-Buffer

NaCl	200 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

Maltose-Lösung

Maltose	10 mM
in Column-Buffer	

Das Amylose-Resin wurde durch folgende Lösungen regeneriert:

H ₂ O	3 SV
0,1 % SDS	3 SV
H ₂ O	1 SV
Column-Buffer	3 SV
Lagerung in 20 % Ethanol	

Lösungen für die Anionenaustausch-Chromatographie:

Säulenpuffer

NaCl	10 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM

Die Q-Sepharose und Nap-Säule wurden durch folgende Lösungen regeneriert:

Säulenpuffer	3 SV
H ₂ O	3 SV
Lagerung in 20 % Ethanol	

2.6.4. Affinitätschromatographie zur Reinigung von GST-ComK_{Bmeg}

Das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde zunächst mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Hierbei diente die N-terminale GST (Glutathion-S-Transferase) als Tag und ein Glutathion-Sepharose-Resin (GE Healthcare) als Säulenmaterial. Das Glutathion-Sepharose-Resin (4 ml Säulenvolumen) wurde in eine Säule geladen und mit 10 SV (Säulenvolumen) Puffer A gewaschen. Anschließend wurde das zellfreie Lysat auf die Säule gegeben und nach dem Durchlaufen mit 10 SV Puffer A gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 5 SV Puffer A mit 20 mM MgCl₂, 50 mM ATP und 1 mg/ml denaturiertem Zellextrakt aus *E. coli* BL21 (DE3) (*E. coli*-Lysat für 10 min bei 65 ° C erhitzt und für 40 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Avanti J-E; Beckman Coulter). Vor der Zugabe wurde die Säule am unteren Ende verschlossen, so dass die Lösung nicht durchlaufen konnte. Das Resin wurde mehrfach resuspendiert, über Nacht bei 4°C inkubiert und mit 10 SV Puffer A

gewaschen. Anschließend wurde der GST-Tag durch Zugabe von 200 µl PreScission Protease (2 U/µl) in 2 ml Puffer A zur fast leer gelaufenen Säule abgeschnitten. Dazu wurde die Säule wieder am unteren Ende verschlossen, das Resin mehrfach resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 10 SV Puffer A gewaschen, wobei die Waschfraktionen zu 1 ml aufbewahrt wurden. Die Elution erfolgte mit 5 SV einer 10 mM Glutathion-Lösung. Hierbei wurden 10 Fraktionen á 1 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Lösungen:

Puffer A

Tris-HCl (pH 8,0)	50,0 mM
NaCl	150,0 mM
EDTA (pH 8,0)	1,0 mM
DTT	5,0 mM

Glutathion-Lösung

Reduziertes Glutathion	10,0 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50,0 mM

Das Glutathion-Sepharose-Resin wurde durch folgende Lösungen regeneriert:

100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 8,5)	2,0 SV
100 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl (pH 4,5)	2,0 SV
1 x PBS	5,0 SV
Lagerung in 20 % Ethanol	

2.6.5. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Bei dem sogenannten Bradford-Test wird die Proteinkonzentration einer Probe photometrisch bestimmt (Bradford, 1976). Der Test basiert auf der Reaktion von Proteinen mit dem Reagenz Coomassie-Brillant-Blue G-250. Dabei fällt ein blauer Farbstoff-Protein-Komplex aus, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen wird. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Test-Kits (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Durch Abgleich mit einer Kalibriergerade einer Proteinlösung mit bekannter Konzentration (hier: BSA) konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.6.6. Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach Lämmli (Laemmli, 1970) unter Berücksichtigung der Modifikationen von Hames (Hames, 1998). Zur Denaturierung der Proteine wurde die zu analysierende Probe mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, wobei die Gele je nach erwarteter Größe der Proteine in ihrer Konzentration an Acrylamid zwischen 10 - 15% (v/v) variieren konnten. Die Elektrophorese erfolgte bei 45 mA pro Gel solange bis die dunkelblaue Bromphenolblau Lauffront des SDS-Probenpuffers das untere Ende des Gels erreichte. Als Größenstandard wurde jeweils der „Protein Molecular Weight Marker“ (Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen.

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele in Färbelösung in einem Mikrowellenofen aufgekocht und danach für ~30 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung inkubiert bis die gefärbten Proteinbanden klar vor dem entfärbten Hintergrund zu erkennen waren. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und in Cellophanfolie getrocknet gelagert.

Lösungen:

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese 40, 29:1, Roth A515.1)

Acrylamid	30,0	% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	1,0	% (w/v)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10,0	% (w/v)
-----	------	---------

Trenngel (12%ig (w/v), für 4 Minigele)

H ₂ O _{deion}	7,0	ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4 % (w/v) SDS	5,0	ml
Acrylamid-Stammlösung	8,0	ml
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	20,0	µl
APS-Lösung	200,0	µl

Sammelgel (6%ig (w/v), für 4 Minigele)

H ₂ O _{deion}	5,5 ml
500 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,4 % (v/v) SDS	2,5 ml
Acrylamid-Stammlösung	2,0 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	10,0 µl
APS-Lösung	100,0 µl

4x SDS-Probenpuffer

Glycerin	40,0 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	2,0 mM
SDS	110,0 mM
Bromphenolblau	3,0 mM
Tris-HCl (pH 6,8)	100,0 mM

Färbelösung

Ethanol	30,0 % (v/v)
Essigsäure	10,0 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,4 % (w/v)

Entfärbelösung

Ethanol	30,0 % (v/v)
Essigsäure	10,0 % (v/v)

Unstained Protein Molecular Weight Marker

(angegeben ist jeweils das relative Molekulargewicht [Da]) 116.000, 66.200, 45.000, 35.000, 25.000, 18.400 und 14.400.

2.6.7. Western-Blot

Zur immunohistochemischen Analyse wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine einem Western-Blot unterzogen. Dabei wurden die Proteine in einem Semidry-Blot Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran übertragen. Die Proteine werden auf dieser Membran durch polare Wechselwirkungen immobilisiert und können durch spezifische Antikörper detektiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion des GST-Tags durch eine Farbreaktion von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Diese wird von dem an den primären Antikörper gebundenen Enzym Alkalische-

Phosphatase katalysiert, so dass kein sekundärer Antikörper verwendet werden musste. Für den Western-Blot wurden direkt nach der SDS-PAGE die Gele sowie zwei Whatmanpaper je Gel in Towbinpuffer äquilibriert. Die zu verwendende PVDF-Transfermembran wurde für 10 min in Methanol aktiviert und dann in Towbinpuffer äquilibriert. Die einzelnen Komponenten wurden für den Blot in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Kathode, Whatmanpaper, SDS-Gel, PVDF-Membran, Whatmanpaper, Anode. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte dann in der Semidry-Blot Apparatur für 15 min bei 15 V und 0,8 mA/cm² Gel (pro einem Gel). Anschließend erfolgte eine Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran durch Inkubation für 1 h bei RT in Blocking-Lösung. Die Membran wurde dann für 1 h bei RT mit Anti-Glutathione-S-Transferase-Alkaline Phosphatase-Antikörper (aus Kaninchen, 1:5000 verdünnt in Blocking-Lösung, Sigma) inkubiert, vier Mal mit 1x PBS-Tween20 für je 10 min bei RT gewaschen und 10 min bei RT in Alkalische Phosphatase-Puffer inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe der Färbelösung mit BCIP und NBT gestartet und bei ausreichender Färbung durch Waschen mit H₂O abgestoppt. Bei der Farbreaktion bildet sich ein bläulich/lila-farbenes Präzipitat. Zur Dokumentation und Archivierung wurde die Membran eingescannt, getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

Lösungen:

Towbinpuffer

Tris-HCl (pH 8,5)	25,0 mM
Glycin	150,0 mM

Roti®-PVDF Transfermembran

Roti®; 0,45 µm Porengröße; 125 µg/cm² Bindekapazität

10 x PBS-Puffer

NaCl	1,37 M
KCl	27,00 mM
Na ₂ HPO ₄	100,00 mM
KH ₂ PO ₄	20,00 mM

1 x PBS-Tween20

10 x PBS	10,0 % (v/v)
Tween20	0,1 % (v/v)

Blocking-Lösung

Milchpulver	5,0 % (w/v)
In 1 x PBS-Tween20	

Alkalische-Phosphatase-Puffer

Tris-HCl (pH 9,5)	100,0 mM
NaCl	100,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM

Färbelösung

Alkalische-Phosphatase-Puffer	20,0 ml
NBT-Lösung (50 mg/ml in 70 % (v/v) DMSO)	132,0 µl
BCIP-Lösung (50 mg/ml in DMF)	33,0 µl

2.6.8. Nicht-radioaktiver „Electrophoretic Mobility Shift Assay“

Mit dem nicht-radioaktiven EMSA („Electrophoretic Mobility Shift Assay“) wird die spezifische Bindung von Proteinen an DNA-Fragmente analysiert. Dabei soll ein verändertes Laufverhalten eines DNA-Protein-Komplexes im Vergleich zu reiner DNA bei einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung des rekombinant produzierten ComK_{Bmeg} Proteins an die putative Promotorregion des Gens *cwIC* aus *B. megaterium* DSM-319 (Gene ID: 9118559) untersucht.

Als putative Promotoregion des Gens *cwIC* wurde die gesamte upstream Region bis zum nächsten ORF (BMD_3169) definiert. Dadurch ergab sich ein Fragment von 379 bp. Das DNA-Fragment wurde mittels PCR mit den Primern „primerTK27fw_PcwIC Trunc 1“ und „primerTK18_PcwIC rev“ amplifiziert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN; Hilden, Germany) gereinigt. Um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung des Proteins an DNA unterscheiden zu können, wurde als Negativkontrolle ein DNA-Fragment eingesetzt, bei dem keine Bindung des ComK erwartet wurde (Kontrollfragment). Hierbei handelte es sich um ein verkürztes DNA-Fragment der *cwIC* upstream Region (134 bp), in der keine ComK Bindestellen vorhergesagt wurden. Das Fragment wurde mit den Primern „primerTK30fw_PcwIC Trunc 4“ und „primerTK18_PcwIC rev“ aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 amplifiziert und analog zu dem *cwIC* Promotofragment behandelt. Für die EMSA-Experimente wurde das gereinigte Protein in unterschiedlichen Mengen (0 - 1000 nM) zu dem Promotorfragment (25 nM) und dem Kontrollfragment (75 nM) gegeben. Der Ansatz wurde mit 2 µl 10x EMSA-Puffer versetzt, mit H₂O_{MilliQ} auf 17 µl aufgefüllt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 3 µl 6x Probenpuffer versetzt. Die

Proben wurden auf ein 5%iges natives Polyacrylamidgel geladen. Diese wurde zuvor ohne Proben für 1 h bei 100 V in der Gelkammer laufen gelassen, um so ein besseres Laufverhalten zu erreichen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V in 0,5x TBE-Puffer bis die untere Laufbande das untere Ende des Gels erreichte. Das Gel wurde anschließend in Ethidiumbromid gefärbt und in der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

Lösungen:

10 x TBE

Tris-HCl (pH 8,0)	891,5	mM
Borsäure	889,5	mM
EDTA (pH 8,0)	31,8	mM

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese 40, 29:1, Roth A515.1)

Acrylamid	40,0	% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	2,0	% (w/v)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

APS	10,0	% (w/v)
-----	------	---------

Polyacrylamidgel (nativ, 5 %ig (w/v), für 2 Gele)

H ₂ O _{deion}	7,90	ml
10 x TBE	0,50	ml
Acrylamid-Stammlösung	1,25	ml
TEMED	16,00	µl
APS-Lösung	66,00	µl

10 x EMSA-Puffer

Tris-HCl (pH 7,5)	100,0	mM
EDTA (pH 7,5)	10,0	mM
DTT	50,0	mM
Glycerin	50,0	% (v/v)
NaCl	100,0	mM
MgCl ₂	10,0	mM
BSA	10,0	mg/ml

2.6.9. Bestimmung der Amylaseaktivität

Die Bestimmung der Amylaseaktivität im Kulturüberstand erfolgte mittels photometrischer Messung eines durch die Enzymaktivität freigesetzten farbigen Substrates mit dem Phadebas Amylase Test Kit (Magle Life Sciences, Lund, Schweden). Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Mathiesen *et al.* (Mathiesen *et al.*, 2008). Für die Kultivierung wurden die zu testenden *B. megaterium* MS-941 Plasmid-Stämme in 500 ml Schikanekolben mit 100 ml LB-Medium und 10 µg/ml Tetrazyklin 1:100 aus einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 250 rpm und 37°C in einem Wasserbadschüttler (Infors, Aquatron). Bei einer OD_{578nm} zwischen 0,3 - 0,4 wurde mit 0,5% (v/v) Xylose induziert. Danach erfolgte die Probennahme und OD-Bestimmung je 3 und 6 h nach der Induktion. Es wurde je 1 ml Proben entnommen und 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Von dem zellfreien Überstand wurde 50 µl in eine neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl Substratlösung, welche durch Lösen einer Tablette des Amylase Test Kits (enthält 45 mg blaue Stärke und Puffer) in 10 ml H₂O_{deion} hergestellt wurde. Die Enzymreaktion erfolgte für 15 min bei 37°C in einem Thermoblock bei 1400 rpm. Sie wurde durch Zugabe von 350 µl 500 mM NaOH abgestoppt und die Proben 5 min bei 13400 rpm zentrifugiert (Minispin, Eppendorf). Anschließend wurde der gesamte lösliche Überstand (~750 µl) abgenommen und in eine Küvette überführt, wobei das sedimentierte unlösliche Substrat in dem Eppendorf Reaktionsgefäß verblieb. Der Überstand weist je nach Stärke der Amylaseaktivität eine schwach bis stark bläuliche Färbung auf. Die photometrische Messung des Überstandes erfolgte bei 620 nm gegen eine Referenzprobe, für welche an Stelle von 50 µl Kulturüberstand das gleiche Volumen H₂O_{deion} für die Enzymreaktion eingesetzt und im Folgenden identisch behandelt wurde.

2.6.10. Lumineszenzbestimmung

Die Bestimmung der Lumineszenzwerte einer zu untersuchenden Kultur erfolgte im 96-well Format unter Verwendung des VarioSkan Flash Platerreader/Inkubator (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). Dazu wurden verschiedene *B. megaterium* Plasmidstämme in 50 ml des jeweiligen Mediums in 300 ml Schikanekolben bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler kultiviert. An den gewählten Messpunkten wurden 200 µl der Kultur in eine 96-well Platte (Kaminform 96 K; 127,8/86/15 mm; weiß, transparenter Boden; Firma Greiner Bio-One) überführt und umgehend im VarioSkan Flash Gerät vermessen. Das Gerät wurde auf 37°C vorgewärmt, der Einsatz „No lid“ verwendet und die 96-well Platte nicht abgedeckt. Die Lumineszenz der Probe wurde über eine Wellenlänge von 360 - 670 nm für 1000 ms/well mit der Einstellung „Dynamic Range: Autorange“ gemessen. Zusätzlich wurde

jeweils die OD_{600nm} für die Probe in jedem well für 100 ms bei einer Bandbreite von 5 nm gemessen. Zur Messung wurde die Software „SkanIt“ (Version 2.4.3.37) des Herstellers verwendet.

2.6.11. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen *B. megaterium* Plasmidstämme wurden mit dem inversen „Axiovert 200M“ Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG; Jena, Deutschland) erstellt. Es wurde die Kamera „AxioVision“ verwendet. Die Proben wurden nach Bedarf kultiviert und zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen. Falls nötig wurden sie in 1x PBS verdünnt und mit einem Volumen von 6 µl auf einen Objektträger aufgetragen. Die Vergrößerung variierte von 20x bis 100x. Es wurden von jeder Probe je ein Bild im Phasenkontrast und ein fluoreszenzmikroskopisches Bild unter Verwendung der entsprechenden Filter erstellt (für Gfp: Filter Set 38 (Zeiss), BP 470/40, FT 495, BP 525/50). Die Bilderfassung und Bearbeitung erfolgte mit der Software „AxioVs20“ des Herstellers. Die Erstellung von überlagerten Bildern mit Phasenkontrast und Fluoreszenz erfolgte automatisch durch die Software unter Verwendung der beiden Einzelaufnahmen.

Lösungen:

PBS-Puffer

NaCl	140,0 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Bakterium *B. megaterium* ist ein vielversprechender Produktionswirt für die Biotechnologie. Dabei ist sowohl für viele Anwendungen als auch die genetische Optimierung des Organismus eine hohe Transformationseffizienz notwendig. Mit den derzeit etablierten Transformationsmethoden kann in *B. megaterium* hierfür jedoch keine ausreichende Transformationseffizienz erzielt werden. Somit ist die Etablierung von effizienteren Transformationsmethoden von großem Interesse.

Die natürliche Kompetenz stellt eine potentielle Methode zu einer einfachen und effizienten Transformation von *B. megaterium* dar. Bei der Genomanalyse des Stammes DSM-319 konnten homologe Gene für alle Gene, die als essentiell für die natürliche Kompetenz in *B. subtilis* bekannt sind, identifiziert werden, darunter auch für das Gen des in *B. subtilis* zentralen Kompetenzregulators ComK (Gamer, 2010). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass *B. megaterium* grundsätzlich zur Ausbildung von natürlicher Kompetenz befähigt ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch die Überproduktion des Proteins ComK_{Bmeg} in *B. megaterium*, im Gegensatz zu der Überproduktion von ComK_{Bsub} in *B. subtilis*, weder ein Einfluss auf die Transformationseffizienz noch auf die Promotoraktivität von Kompetenzgenen festgestellt werden (Gamer, 2010). Daher ist davon auszugehen, dass ComK_{Bmeg} in *B. megaterium* nicht als der alleinige zentrale Regulator der natürlichen Kompetenz fungiert. Auch bei der Überproduktion vom ComK_{Bsub} in *B. megaterium* DSM-319 konnte keine Induktion der untersuchten Promotoren festgestellt werden, was ebenfalls eine unterschiedliche Regulation der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* und *B. megaterium* anzeigt (Gamer, 2010). Darüber hinaus fehlen bislang Informationen zu den regulatorischen Grundlagen und Bedingungen, unter denen natürliche Kompetenz in *B. megaterium* ausgebildet werden könnte, weshalb in dieser Arbeit die Regulation und die induzierenden Bedingungen der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* untersucht werden sollten.

Dazu wurden einerseits verschiedene *B. megaterium* Wildtypstämme auf ihre Transformierbarkeit mittels natürlicher Kompetenz untersucht. Bei effizient transformierbaren Stämmen sollte durch weitere Analysen Erkenntnisse über die regulatorischen Grundlagen gewonnen werden. Weiterhin sollten Bedingungen gefunden werden, bei welchen natürliche Kompetenz in *B. megaterium* induziert werden könnte. Die erfolgreiche Transformation einer Zelle mittels natürlicher Kompetenz ist ein komplexer Vorgang und hängt von dem korrekten Zusammenspiel vieler Faktoren ab. So müssen, um eine Zelle zu transformieren, alle erforderlichen Gene transkribiert, translatiert, die Proteine korrekt gefaltet und lokalisiert, die extrazelluläre DNA erfolgreich aufgenommen und schließlich ins Genom integriert werden. Falls es bei einem dieser Schritte zu einer negativen Regulation kommt, findet keine natürliche Transformation statt. Daher sollte zunächst nicht die Transformation von Zellen als Parameter zur Untersuchung der Kompetenz-induzierenden Bedingungen genutzt werden,

sondern die Aktivität der Promotoren Kompetenz-assoziiierter Gene. Dabei wurde davon ausgegangen, dass hierbei möglichst wenig regulatorische Schritte wirken und somit auch bei weniger definierten Bedingungen Ergebnisse hinsichtlich Kompetenz-induzierender Bedingungen erzielt werden könnten.

Schließlich wurde zur Klärung regulatorischer Grundlagen der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* das Protein ComK_{Bmeg} genauer untersucht. Genauere Erkenntnisse, beispielsweise über das DNA-Bindeverhalten oder den Oligomerisationsstatus, sollten Hinweise auf eine mögliche (neue) Funktion geben. Dazu wurde ComK_{Bmeg} rekombinant produziert und gereinigt, um anschließend proteinbiochemisch analysiert zu werden.

3.1. Ausbildung natürlicher Kompetenz bei verschiedenen *Bacillus megaterium* Stämmen

Sowohl für *B. subtilis* als auch für andere natürlich kompetente Arten ist bekannt, dass es große Unterschiede hinsichtlich der Transformationseffizienz zwischen verschiedenen Stämmen einer Art gibt (Nijland *et al.*, 2010). Dabei lassen sich manche Stämme überhaupt nicht transformieren, während andere eine hohe Transformationseffizienz aufweisen. Daher sollten auch für *B. megaterium* verschiedene Stämme auf ihre Transformierbarkeit mittels natürlicher Kompetenz untersucht werden, um gegebenenfalls das Genom von transformierbaren Stämmen zu sequenzieren und so Aussagen über regulatorische Mechanismen und die genetische Ausstattung treffen zu können.

Zur Überprüfung der Transformierbarkeit der verschiedenen *B. megaterium* Stämme mittels natürlicher Kompetenz wurde das für *B. subtilis* etablierte „Zwei-Schritt Transformationsprotokoll“ verwendet (Harwood und Cutting, 1991). Bei *B. subtilis* handelt es sich um die nächst verwandte Art von *B. megaterium*, für die ein Protokoll zur natürlichen Transformation etabliert ist. Da Informationen über mögliche Kompetenz-induzierende Bedingungen bei *B. megaterium* bislang fehlen, wurde dieses etablierte Protokoll für erste Versuche verwendet. Ein Teil dieser Arbeiten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Patrick Heeger durchgeführt. Bei den in dieser Arbeit getesteten Stämmen handelte sich um *B. megaterium* DSM-32, DSM-319, DSM-321, DSM-337, DSM-509, DSM-1517, DSM-1804, DSM-3228 und DSM-3641. Die Stämme wurden einzeln in SpC-Medium bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Nach weiterer Präparation der Zellen wurden ~ 500 ng des Plasmids pBC16-1 hinzugegeben. Dabei handelt es sich um ein 3056 bp großes Plasmid aus *Bacillus cereus* (Kreft *et al.*, 1978). Dieses Plasmid konnte bereits mittels Protoplastentransformation in *B. megaterium* DSM-319 eingebracht werden und wird in diesem repliziert (persönliche Kommunikation, Dr. Rebekka Biedendieck). Somit sollte es zur Überprüfung der Transformation von *B. megaterium* mittels natürlicher Kompetenz

geeignet sein. Das Plasmid pBC16-1 trägt ein Gen für Tetrazyklinresistenz und erlaubt somit die Selektion transformierter Zellen mit Tetrazyklin. Als Positivkontrolle wurde jeweils *B. subtilis* 168 entsprechend behandelt. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz des zu testenden *B. megaterium* Stammes, zu dem kein Plasmid hinzugegeben wurde.

Für den *B. megaterium* Stamm DSM-3641 konnten in drei unabhängigen Versuchen je 3, 1 und 3 positive Transformanten festgestellt werden. Eine mikroskopische Überprüfung der Kolonien bestätigte, dass es sich um *B. megaterium* handelte. Bei allen anderen getesteten Stämmen konnten keine Transformanten beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob die positiven Transformanten des Stammes DSM-3641 tatsächlich das Plasmid pBC16-1 aufgenommen haben, wurde aus einem der erhaltenen Klone das Plasmid isoliert und anschließend identifiziert. Zur Identifikation der isolierten Plasmid-DNA wurde aus *B. megaterium* DSM-319, in welchen zuvor das Plasmid pBC16-1 mittels Protoplastentransformation eingebracht wurde, ebenfalls Plasmid-DNA isoliert. Die isolierten Plasmide aus den beiden Stämmen wurden durch den Restriktionsverdau mit einem spezifischen Restriktionsenzym und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

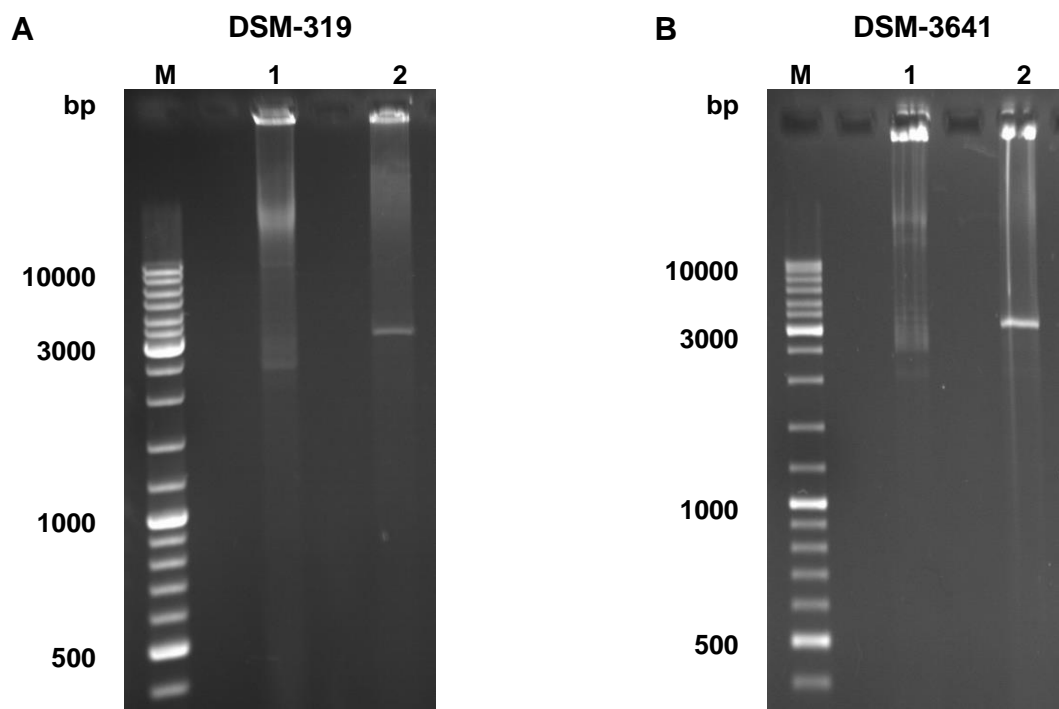


Abbildung 3.1.1. Bild der Agarose-Gelelektrophorese der isolierten Plasmid-DNA aus mit dem Plasmid pBC16-1 transformierten (A) *B. megaterium* DSM-319 und (B) *B. megaterium* DSM-3641 Zellen. Das Plasmid pBC16-1 wurde mittels Protoplastentransformation in *B. megaterium* DSM-319 bzw. mittels Zwei-Schritt Protokoll in *B. megaterium* DSM-3641 eingebracht. Aus beiden Stämmen wurde Plasmid-DNA isoliert und je unverdaut (Spur 1) sowie nach einem Verdau mit EcoRI (Spur 2) zusammen mit einem Größen- und Mengenstandard (Bahn M; GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung (A) ist das Ergebnis für die Plasmid-DNA aus *B. megaterium* DSM-319 und in Abbildung (B) das Ergebnis für die Plasmid-DNA aus *B. megaterium* DSM-3641 zu sehen.

Das Gelbild der Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 3.1.1.A) zeigte, dass aus *B. megaterium* DSM-319 Plasmid-DNA isoliert werden konnte (Spur 1: unverdautes Plasmid). Nach einem Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit dem Enzym EcoRI, für das in dem Plasmid pBC16-1 eine einzelne Restriktionsschnittstelle enthalten ist, konnte eine Bande bei ~3000 bp beobachtet werden, was auf ein linearisiertes Plasmid schließen lässt (Spur 2). Da es sich bei *B. megaterium* DSM-319 um einen plasmidlosen Stamm handelt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten Plasmid um das zur Protoplastentransformation eingesetzte Plasmid pBC16-1 handelte. Darüber hinaus entspricht das Plasmid mit einer Größe von ~3000 bp der erwarteten Größe von pBC16-1 mit 3056 bp (Kreft *et al.*, 1978).

In Abbildung 3.1.1.B ist das Ergebnis der Plasmidpräparation des positiven Klon von *B. megaterium* DSM-3641 zu sehen. Wie zu erkennen ist, konnte Plasmid-DNA isoliert werden (Spur 1: unverdautes Plasmid). In Spur 2 ist die EcoRI verdaute Plasmid-DNA zu sehen. Bei dem EcoRI verdauten Plasmid ließ sich analog zu dem aus *B. megaterium* DSM-319 isolierten pBC16-1 eine Bande bei ~3000 bp beobachten.

Der Vergleich der Bandenmuster des aus *B. megaterium* DSM-319 isolierten Plasmids pBC16-1 und des aus *B. megaterium* DSM-3641 isolierten Plasmids zeigte eine hohe Übereinstimmung. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem aus DSM-3641 isolierten Plasmid um pBC16-1 handelte und somit eine erfolgreiche Transformation dieses Stammes stattgefunden hat.

Mit dem hier dargestellten Versuch konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass der *B. megaterium* Stamm DSM-3641 mit dem Zwei-Schritt Protokoll transformiert werden kann. Jedoch kann an dieser Stelle nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich tatsächlich um natürliche Transformation, also die aktive Aufnahme der extrazellulären DNA durch die Zelle, oder einen anderen Mechanismus handelte. Da weder die Genomsequenz des Stammes DSM-3641 noch andere Informationen über diesen Stamm vorliegen, können auch keine weiteren Aussagen über die genetische Ausstattung getroffen, oder vergleichende Studien mit anderen Bakterienarten durchgeführt werden. Insgesamt zeigte der Stamm auch bei variierten Bedingungen des Protokolls eine geringe Transformationseffizienz (Ergebnisse nicht gezeigt). So konnte für den als Positivkontrolle getesteten Stamm *B. subtilis* 168 bei dem gleichen Versuchsansatz ~200 Transformanten festgestellt werden. Angesichts der sehr geringen Anzahl an positiven Transformationsergebnissen erschien es im Rahmen dieser Arbeit fraglich, ob der Aufwand einer Genomsequenzierung und weiterer Untersuchungen mit diesem nicht etablierten und unbekannten Stamm zu rechtfertigen ist. Daher wurden zunächst keine weiteren Untersuchungen mit dem Stamm *B. megaterium* DSM-3641 durchgeführt.

Bezüglich der anderen untersuchten Stämme lässt sich an Hand der hier durchgeführten Versuche keine Aussage über natürliche Kompetenz treffen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Stämme unter anderen Bedingungen natürliche Kompetenz ausbilden. Auch für diese Stämme wurden in dieser Arbeit verschiedene Parameter des Zwei-Schritt Protokolls variiert, um mögliche induzierende Bedingungen der natürlichen Kompetenz zu identifizieren. Unter anderem wurde versucht, die natürliche Kompetenz in *B. megaterium* DSM-319 durch Zugabe des Kulturüberstandes einer natürlich kompetenten *B. subtilis* 168 Kultur zu induzieren. Dadurch sollte überprüft werden, ob die von *B. subtilis* sekretierten Kompetenz-induzierenden Signalmoleküle einen Effekt auf *B. megaterium* Zellen ausüben. Es konnten jedoch keine positiven Transformanten bei den so behandelten *B. megaterium* Zellen beobachtet werden. Die von *B. subtilis* 168 sekretierten Signalmoleküle scheinen also keine natürliche Kompetenz in *B. megaterium* DSM-319 zu induzieren. Auch alle weiteren Variationen der Bedingungen zeigten keinen Erfolg (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in *Bacillus megaterium* DSM-319

3.2.1. Etablierung der bakteriellen Luziferase als Reportersystem für *Bacillus megaterium*

Um erste Hinweise auf die Bedingungen zu erhalten, unter denen natürliche Kompetenz in *B. megaterium* ausgebildet werden könnte, sollte die Aktivität von Promotoren Kompetenz-assoziiierter Gene über ein Reportergen untersucht werden. Dessen Expression würde einen indirekten Hinweis der natürlichen Kompetenz sowie regulatorischer Zusammenhänge liefern. In vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe wurde Gfp (green fluorescent protein) als Reporterprotein etabliert (Biedendieck *et al.*, 2007; Gamer, 2010; Stammen, 2010). Allerdings weist Gfp im Vergleich zu anderen Reporterproteinen eine verhältnismäßig geringe Signalintensität auf (Hakkila *et al.*, 2002; Uliczka *et al.*, 2011). Da es sich bei der natürlichen Kompetenz um einen limitierten und energetisch aufwendigen Prozess handelt, ist davon auszugehen, dass die untersuchten Promotoren eine relativ geringe Transkriptionsrate aufweisen, woraus sich eine geringe Menge an Reporterprotein ergeben würde. Zusätzlich konnte bei einigen Bakterienarten eine starke Kulturheterogenität bei der Ausbildung natürlicher Kompetenz festgestellt werden. So bilden beispielsweise bei *B. subtilis* nur ~10% der Zellen einer Population natürliche Kompetenz aus (Hajjema *et al.*, 2001). Sollte bei *B. megaterium* eine ähnliche Kulturheterogenität auftreten, ergäbe sich auf eine gesamte Kultur bezogen eine noch geringere Menge an Reporterprotein. So ergab sich auf Grund der schwachen Signalintensität von Gfp, der erwarteten schwachen

Promotoraktivität und einer möglichen Kulturheterogenität der Bedarf nach einem alternativen, signalintensiveren Reportersystem.

Als alternatives Reportersystem sollte daher im Rahmen dieser Arbeit das bakterielle Luziferase-System für *B. megaterium* etabliert werden. So weit bekannt, wurde dieses System hier zum ersten Mal in diesem Bakterium eingesetzt. Bei der bakteriellen Luziferase wird Lumineszenz als Signal detektiert. Diese Emission von Licht ist die Folge einer enzymatischen Reaktion. Dabei katalysiert das Enzym Luziferase in Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation von reduziertem Flavinmononukleotid (FMNH₂) und einem langkettigen aliphatischen Aldehyd. Als Produkt entstehen Flavinmononukleotid (FMN), die entsprechende langkettige Fettsäure, H₂O sowie Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm. Das in dieser Arbeit eingesetzte bakterielle Luziferase-System wird von dem ~5 kb Operon *luxCDABE* codiert. Dabei codieren die Gene *luxA* und *luxB* für die beiden Untereinheiten der heterodimeren Luziferase und die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE* für einen Fettsäure-Reduktase-Komplex, der für die Regeneration des Substrats verantwortlich ist, so dass dieses nicht extern zugegeben werden muss. Des Weiteren findet die Reaktion *in vivo* in der Zelle statt, was eine kontinuierliche Messung ohne Probenaufbereitung oder Unterbrechung der Kultivierung ermöglicht (Hakkila *et al.*, 2002). Zusammen mit einer hohen Signalintensität stellt die bakterielle Luziferase damit ein gut geeignetes System zur Untersuchung der Promotoraktivität unter verschiedenen Bedingungen dar.

3.2.1.1. Konstruktion eines Plasmids für die induzierbare Produktion des bakteriellen Luziferase Systems

Die Anwendbarkeit des bakteriellen Luziferase Systems in *B. megaterium* sollte zunächst mit einem Plasmid überprüft werden, welches das *luxCDABE* Operon trägt und die Induktion der Genexpression des Operons erlaubt. Dafür wurde das *luxCDABE* Operon downstream des optimierten Xylose-induzierbaren Promotors des Plasmids p3STOP1623hp kloniert (Stammen *et al.*, 2010). Somit kann durch Zugabe von Xylose zu dem Medium die Expression des Operons induziert werden. Bei dem verwendeten Plasmid handelt es sich um ein etabliertes Expressionsplasmid, dessen Promotor in vorangegangenen Arbeiten gentechnisch optimiert wurde, so dass eine starke Genexpression stattfindet. Auf Grund seiner Eigenschaft als „Shuttlevektor“ konnte die Klonierung in *E. coli* durchgeführt und das Plasmid anschließend in *B. megaterium* eingebracht werden. Das hier konstruierte Plasmid wurde als pTKBm08 bezeichnet (Abb. 3.1.2).

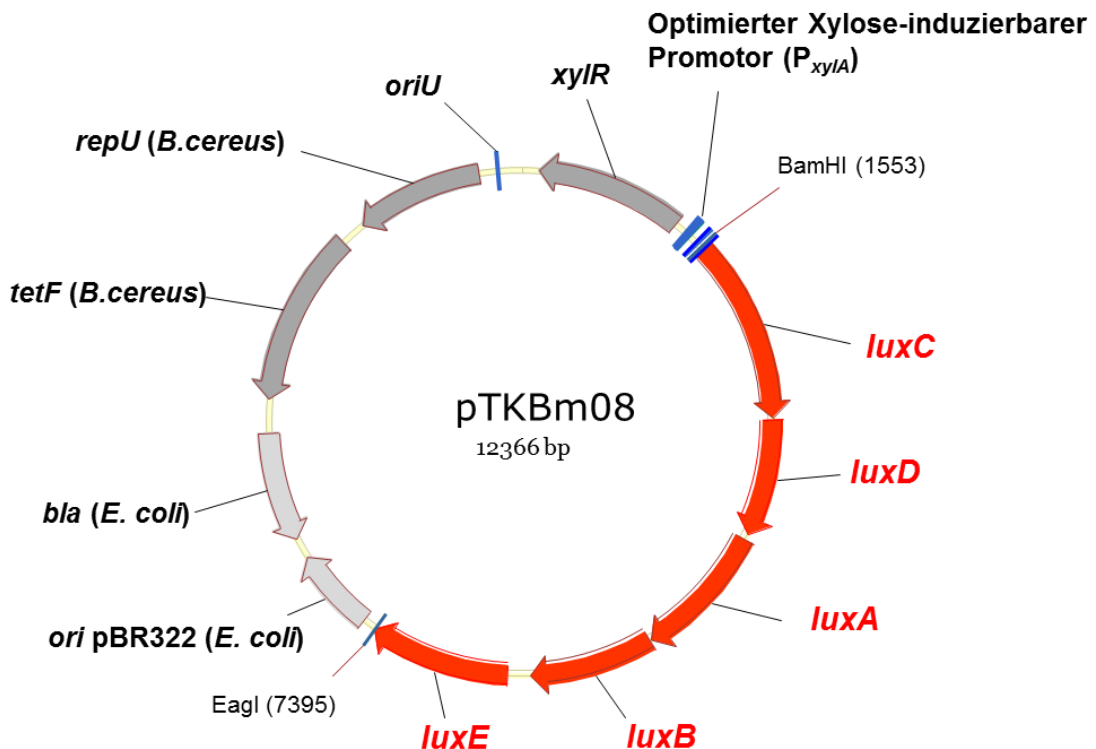


Abbildung 3.1.2. Plasmidkarte des Plasmids pTKBm08 zur induzierbaren Expression des für die bakterielle Luziferase codierenden *luxCDABE* Operons. Die einzelnen Elemente des Plasmids sind schematisch als Blockpfeile dargestellt. Die Funktion der Elemente kann der Beschriftung entnommen werden. Das *luxCDABE* Operon ist in roten Pfeilen dargestellt. Der optimierte Promotor ist upstream des Operons dargestellt. Für *E. coli* relevante Gene sind als hellgraue Blockpfeile dargestellt. Für *B. megaterium* relevante Gene sind als dunkelgraue Blockpfeile dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen BamHI und EagI, über die das *luxCDABE* Operon kloniert wurde, sind mit relativer Basenposition angegeben.

3.2.1.2. Untersuchung der Funktionalität des bakteriellen Luziferase Systems in *Bacillus megaterium*

Um die Funktionalität des bakteriellen Luziferase System (*luxCDABE*) als Reporter in *B. megaterium* zu untersuchen, wurde das zuvor konstruierte Plasmid, in dem das *luxCDABE* Operon unter Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors liegt (pTKBm08), mittels Protoplastentransformation in den *B. megaterium* Stamm MS-941 eingebracht. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein Derivat des Wildtypstammes *B. megaterium* DSM-319, bei dem die extrazelluläre Protease NprM durch eine teilweise Deletion des Gens *nprM* nicht mehr funktional ist (Wittchen und Meinhardt, 1995). Dieser Stamm wird zur rekombinanten Proteinproduktion eingesetzt und diente daher hier zur Überprüfung des bakteriellen Luziferase Systems (Stammen *et al.*, 2010). Zwei parallele Ansätze der Plasmidstämme wurden in Schaeffers Sporulationsmedium im Schüttelkolben kultiviert und in regelmäßigen Abständen sowohl die OD_{600nm} als auch die emittierte Lumineszenz im

96-well Format gemessen. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von $\sim 0,5$ wurde in einer der Kulturen die Expression des *luxCDABE*-Operons induziert. Die erhaltenen Lumineszenzwerte (RLU: relative light units) wurden gegen die jeweilige OD_{600nm} der gemessenen Probe normalisiert (Lumineszenz pro OD_{600nm} (RLU/OD)).

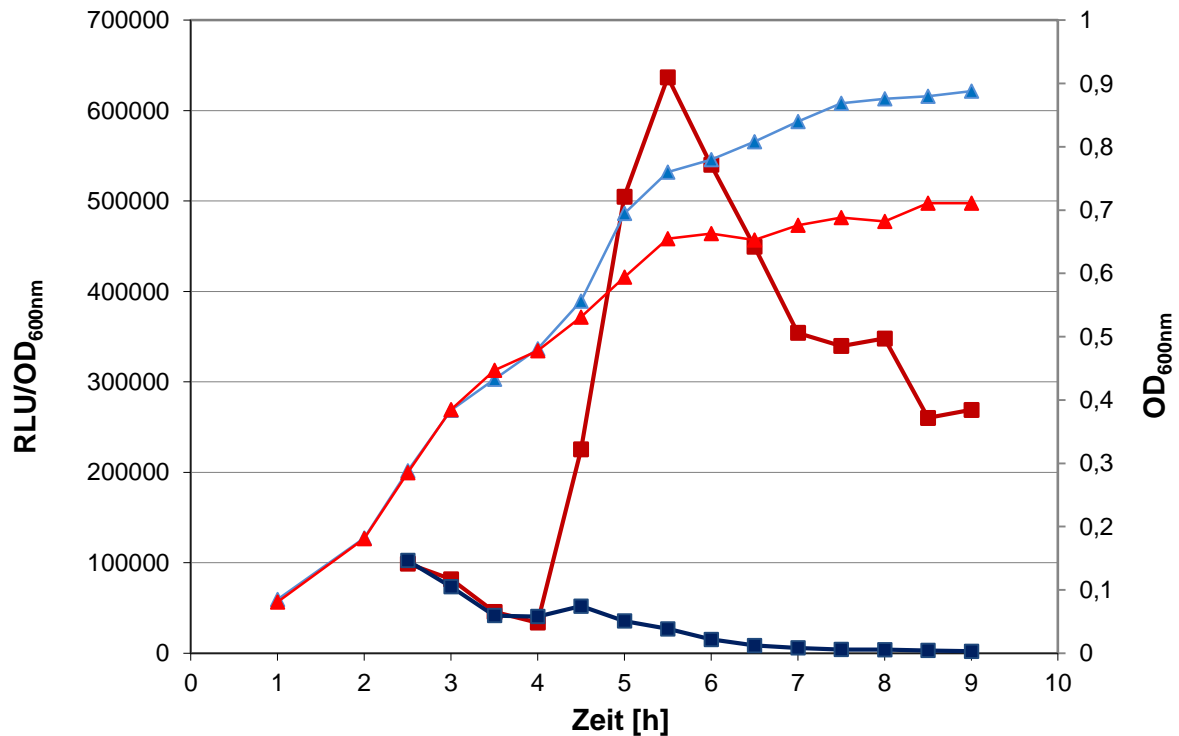


Abbildung 3.1.3: Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer *luxCDABE* induzierten und einer nicht-induzierten *B. megaterium* MS-941 Kultur. *B. megaterium* MS-941 wurde mit einem Plasmid transformiert, welches das bakterielle Luziferase System *luxCDABE* unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors enthält (pTKBm08). Hiervon wurden zwei separate Kulturen in Schaeffers Sporulationsmedium bei 37°C und 250 rpm in Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte beider Kulturen wurde alle 30 min im 96-well Format bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (nicht-induziert: blaue Dreiecke; induziert: rote Dreiecke). Ab $t = 2,5$ h nach Beginn der Kultivierung wurde parallel zur Messung der OD_{600nm} die emittierte Lumineszenz beider Kulturen gemessen. Bei einer Kultur erfolgte die Induktion der Genexpression des *luxCDABE* Operons durch Zugabe von 0,5% Xylose bei einer OD_{600nm} von $\sim 0,5$ ($t = 4$ h). In der Abbildung sind die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) der induzierten (rote Rechtecke) und der nicht-induzierten Kultur (blaue Rechtecke) dargestellt.

Das Wachstum der beiden Kulturen verlief bis zum Zeitpunkt der Induktion ($OD_{600nm} \sim 0,5$; $t = 4$ h) nahezu identisch (Abb. 3.1.3). Nach der Induktion einer Kultur konnte für diese ein schlechteres Wachstum im Vergleich zu der nicht-induzierten Kultur beobachtet werden. Beide Kulturen wuchsen jedoch weiter und erreichten ungefähr zum gleichen Zeitpunkt die stationäre Phase, wobei die nicht-induzierte Kultur eine höhere finale Zelldichte erreichte. Bezüglich der hier im 96-well Format im VarioSkan Platerereader gemessenen OD_{600nm} ist zu beachten, dass die Werte auf Grunde der verschiedenen Schichtdicken nicht den Werten

einer standardmäßigen Bestimmung der optischen Dichte mit einem Photometer in einer Küvette entsprechen.

Für die gemessene Lumineszenz pro OD_{600nm} (RLU/OD) ließ sich ebenfalls bis zum Zeitpunkt der Induktion kein Unterschied zwischen den beiden Kulturen feststellen. Nach der Induktion stieg die RLU/OD der induzierten Kultur bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bis zu einem maximalen Wert von $6,37 \times 10^5$ RLU/OD an ($t = 5,5$ h) und ging danach stetig zurück, wobei jedoch bis zum Ende der Messreihe ($t = 9$ h) Lumineszenz detektiert werden konnte. Bei der nicht induzierten Kultur wurde zu jedem Messpunkt ein nahezu gleichbleibender RLU/OD Wert gemessen. Dabei waren die Werte nach dem Zeitpunkt der Induktion zu jedem Messpunkt deutlich geringer als für die induzierte Kultur und erreichten einen maximalen RLU/OD Wert von $5,21 \times 10^4$ zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase ($t = 4,5$ h). Somit lag der Wert der maximalen RLU/OD für die induzierte Kultur um den Faktor ~ 12 höher als bei der nicht-induzierten Kultur.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich das bakterielle Luziferase System für Untersuchungen in *B. megaterium* nutzen lässt. So war zum einen nach der Induktion des Systems ein deutliches Lumineszenzsignal detektierbar. Zum anderen wuchs *B. megaterium* auch nach der Induktion weiter, wobei durch die metabolische Last durch Expression und Proteinbiosynthese der bakteriellen Luziferase das Wachstum abgeschwächt war. Es ist zu berücksichtigen, dass mit dem Plasmid p3STOP1623hp ein starkes Expressionssystem eingesetzt wurde, dass in anderen Arbeiten zur starken Überproduktion von Proteinen im Gramm pro Liter Maßstab genutzt wurde (Stammen *et al.*, 2010). Bei Arbeiten mit schwächeren Promotoren, wie sie im Falle der natürlichen Kompetenz zu erwarten waren, war daher eine deutlich geringere metabolische Last und somit auch ein geringerer Einfluss auf das Wachstum der Zellen zu erwarten.

Die enzymatische Reaktion des bakteriellen Luziferase System ist O₂ und ATP abhängig. Somit ist sie für anaerobe/microaerobe und nährstofflimitierte Bedingungen schlecht geeignet. Dies könnte den Rückgang der RLU/OD während der stationären Wachstumsphase erklären. Die Abnahme der Lumineszenzintensität kann somit auf eine Verringerung der Promotoraktivität oder auf eine durch ATP-Mangel bedingte Abschwächung der Enzymreaktion hindeuten (Hakkila *et al.*, 2002). Trotz dieser Limitationen stellt das bakterielle Luziferase System ein effektives Reportersystem dar, das auch in *B. megaterium* eingesetzt werden kann. Daher wurde es in den folgenden Experimenten zur Untersuchung der Promotoraktivität ausgewählter Kompetenz-assoziiierter Gene eingesetzt.

3.2.2. Konstruktion von Reporterplasmiden zur Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die bakterielle Luziferase in *B. megaterium* funktional ist, sollte es als Reportersystem zur Untersuchung der Promotoraktivität ausgewählter Kompetenz-assoziiierter Gene aus *B. megaterium* DSM-319 verwendet werden. Bei den ausgewählten Genen bzw. Operons handelte es sich um *comGABCD EFG*, *comEABC*, *comFAC*, *ssbB* und *comK*. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die untersuchten Operons in verkürzter Form benannt (*comG* = *comGABCD EFG*, *comE* = *comEABC* und *comF* = *comFAC*). Die Auswahl der Gene bzw. Operons erfolgte auf Grund ihrer beschriebenen essentiellen Funktion bei der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* und anderen Bakterienarten. So codiert das *comG* Operon für die Proteine des Pseudopilus, das *comE* Operon für Proteine für die Bindung extrazellulärer DNA (ComEA) und die Pore in der Zellmembran (ComEC) und das *comF* Operon für Proteine, die für den Transport der DNA durch die Pore verantwortlich sind (ComFA, ComFB). Das Protein SsbB wiederum spielt beim Schutz der aufgenommenen DNA vor Nukleasen und der homologen Rekombination ins Wirtsgenom eine Rolle. ComK ist in *B. subtilis* der zentrale Regulator der natürlichen Kompetenz (Johnsborg *et al.*, 2007). Da die Promotoren der Gene nicht genauer charakterisiert sind, wurde hier jeweils der gesamte nicht-codierende Bereich upstream des Gens bis zum nächstliegenden Gen als Promotorfragment definiert. Die Auswahl dieser Bereiche erfolgte auf Basis der bekannten Genomsequenz von *B. megaterium* DSM-319 (MegaBac Datenbank, Version 9; <http://www.megabac.tu-bs.de/>). Diese Promotorfragmente wurden Plasmid-ständig upstream des *luxCDABE* Operons in das Plasmid pTKBm10 kloniert (Abb. 3.1.4).

Bei den folgenden Untersuchungen konnte für das Promotorfragment von *comE* keine Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine anschließende Literaturrecherche zu *comEABC* in *B. megaterium* ergab, dass der hier ausgewählte Bereich keinen Promotor enthält (Lammers *et al.*, 2004), weshalb dieses Konstrukt bei den weiteren Analysen nicht weiter berücksichtigt wurde.

Als Negativkontrolle diente ein Plasmid ohne Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons.

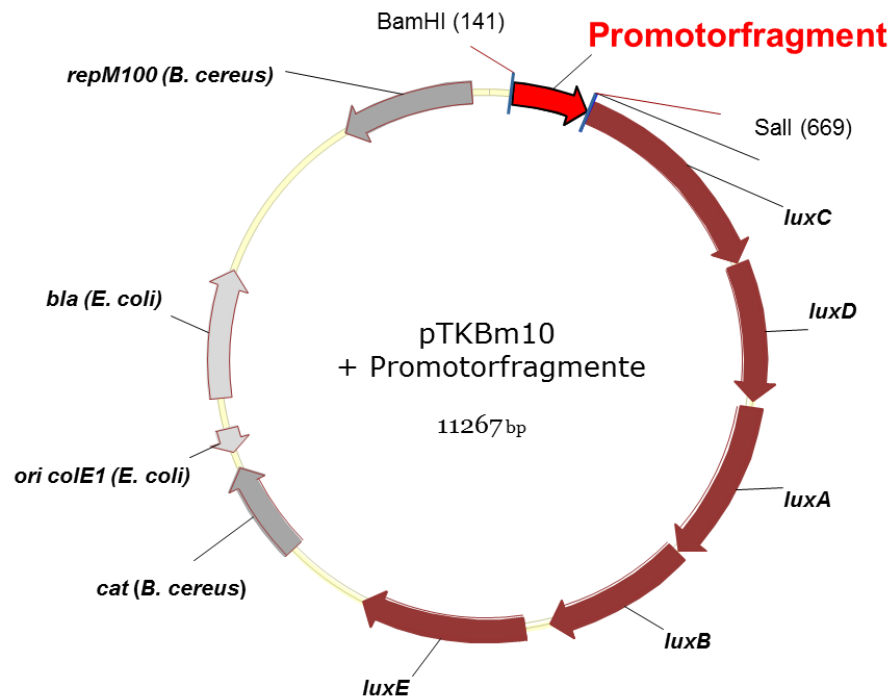


Abbildung 3.1.4. Allgemeine Karte der Plasmide zur Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener Kompetenz-assoziiierter Gene mittels bakterieller Luziferase. Die einzelnen Elemente des Plasmids sind schematisch als Blockpfeile dargestellt. Die Funktion der Elemente kann der Beschriftung entnommen werden. Dabei sind funktionelle Elemente für die Klonierung in *E. coli* in hellgrau, die für die Replikation und Expression in *B. megaterium* dunkelgrau angegeben. Das jeweils getestete Promotorfragment ist als roter Blockpfeil dargestellt. Die als Reporter dienende bakterielle Luziferase ist in dem *luxCDABE* Operon downstream des Promotorfragments codiert (dunkelrote Blockpfeile). Die für die Klonierung der jeweiligen Promotorfragmente genutzten Restriktionsschnittstellen BamHI und Sall sind mit relativen Basenpositionen angegeben.

3.2.3. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in *Bacillus megaterium* DSM-319

Da es bislang keine Daten für die Kompetenz-induzierenden Bedingungen für *B. megaterium* gibt, wurde die Aktivität der ausgewählten Promotorfragmente zunächst unter den für die Kultivierung von *B. megaterium* etablierten Bedingungen untersucht (LB-Medium, 37°C, 250 rpm in Erlenmeyerkolben mit Schikanen). Außerdem wurde der Wildtypstamm DSM-319 verwendet, in den die zuvor beschriebenen Plasmide mittels Protoplastentransformation individuell eingebracht wurden. Die OD_{600nm} und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format von jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten gemessen und die erhaltenen Lumineszenzwerte (RLU: relative light units) gegen die jeweilige OD_{600nm} der gemessenen Probe normalisiert (RLU/OD) (Abb. 3.1.5 bis 3.1.7). Das Wachstum aller Plasmidstämme unterschied sich nicht vom Wachstum des Kontrollstamms ohne Plasmid. Für den *B. megaterium* DSM-319 Plasmidstamm mit dem als Negativkontrolle fungierendem Plasmid, das keinen Promotor upstream des *luxCDABE* Operons enthält, zeigte die RLU/OD

zu allen Messpunkten einen annähernd gleichbleibenden Wert im Bereich von < 100 RLU/OD (nicht gezeigt). Darüber hinaus waren die gemessenen Werte in Relation zu den bei dem Xylose-induzierbaren System gemessenen Werten (bis 637000 RLU/OD) vernachlässigbar und konnten daher als Hintergrundsignal betrachtet werden (Abb. 3.1.3). Somit sollten Lumineszenzsignale über dem Niveau der Negativkontrolle auf die spezifische Promotoraktivität der eingebrachten Promotorfragmente zurückzuführen sein.

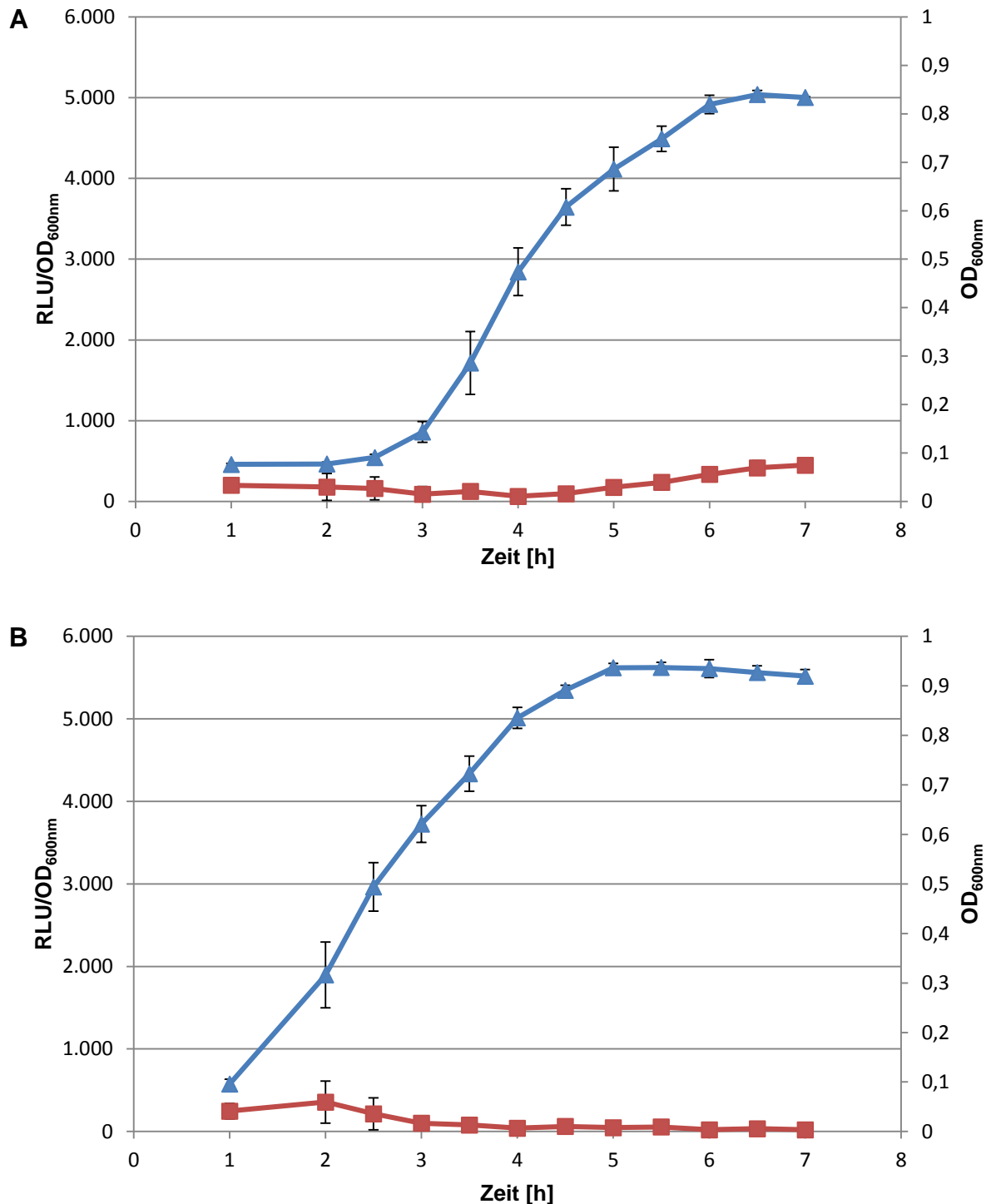


Abbildung 3.1.5. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 transformiert mit einem Plasmid mit (A) dem *comK* Promotorfragment bzw. (B) dem *comF* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 wurde mit einem Plasmid transformiert, welches (A) das *comK* Promotorfragment (pTKBm13) bzw. (B) das *comF* Promotorfragment (pTKBm15) upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Die Stämme wurden separat in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (blaue Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platerereader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (rote Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten

Für *B. megaterium* DSM-319 transformiert mit einem Plasmid mit dem *comK* Promotorfragment (Abb. 3.1.5.A) bzw. dem *comF* Promotorfragment (Abb. 3.1.5.B) upstream des *luxCDABE* Operons konnte zu keinem der Messpunkte ein signifikant über dem Hintergrundlevel liegender RLU/OD Wert gemessen werden. Für diese Promotorfragmente konnte unter diesen Bedingungen also keine Aktivität nachgewiesen werden.

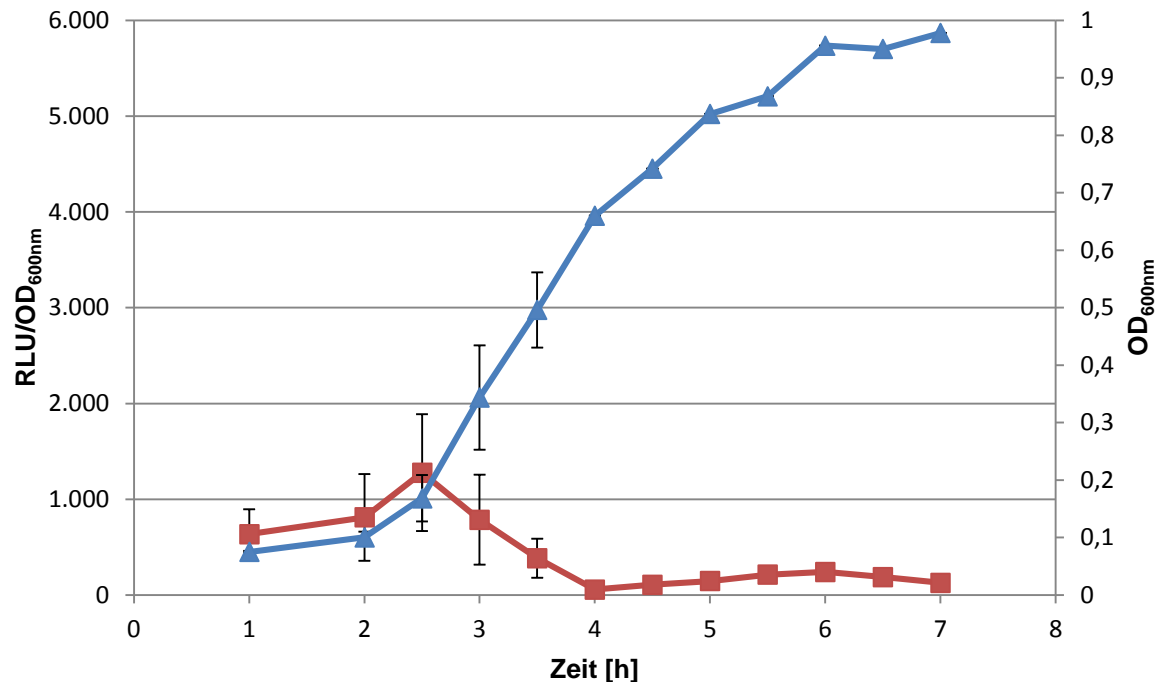


Abbildung 3.1.6. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 transformiert mit einem Plasmid mit dem *ssbB* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 wurde mit einem Plasmid transformiert, welches das *ssbB* Promotorfragment (pTKBm12) upstream upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Der Stamm wurde in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (blaue Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platerader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (rote Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

Für *B. megaterium* DSM-319 transformiert mit dem Plasmid pTKBm12 mit dem *ssbB* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons ließ sich ein Maximum der RLU/OD zu Beginn der exponentiellen Phase mit 1278 RLU/OD beobachten (Abb. 3.1.6). Im Laufe der frühen exponentiellen Phase verringerte sich die RLU/OD wieder auf den Wert des Hintergrundsignals. Diese Beobachtung weist somit auf eine Aktivität des Promotors von *ssbB* unter den hier verwendeten Bedingungen zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase hin, wobei in späteren Wachstumsphasen keine Aktivität mehr nachweisbar war.

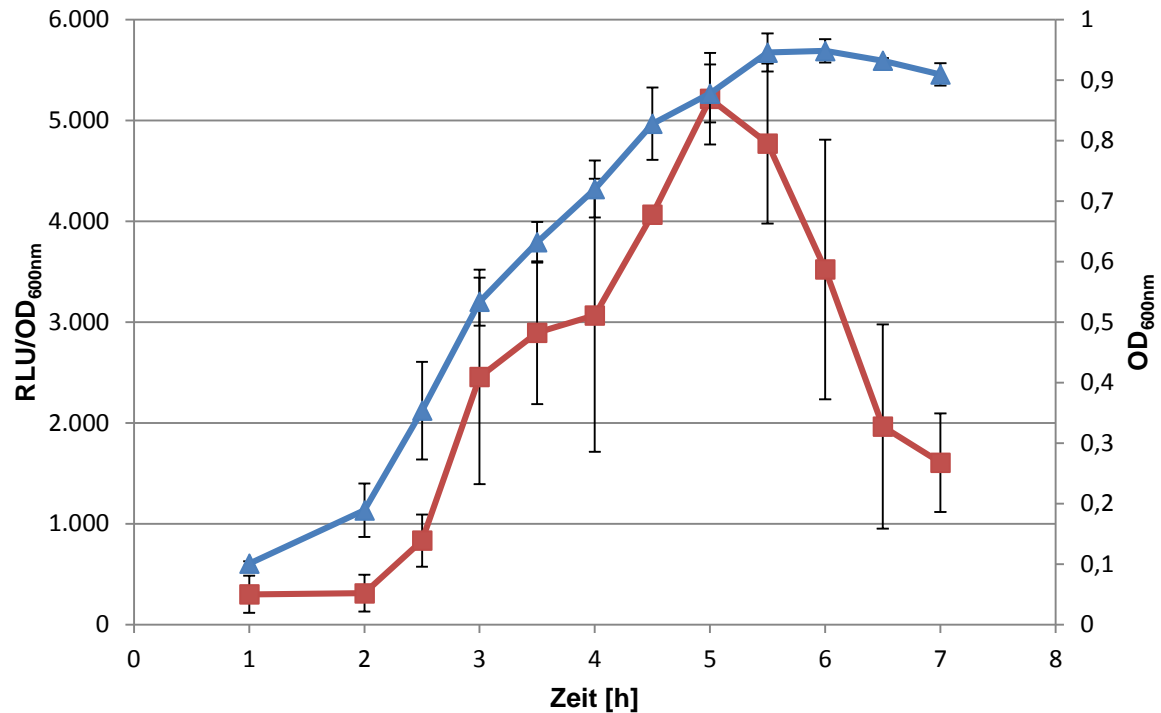


Abbildung 3.1.7. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 transformiert mit einem Plasmid mit dem *comG* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 wurde mit einem Plasmid transformiert, welches das *comG* Promotorfragment (pTKBm10) upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Der Stamm wurde in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (blaue Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platereader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (rote Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

Trug *B. megaterium* DSM-319 ein Plasmid mit dem *comG* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons, stieg der RLU/OD Wert mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich bis zum Beginn der stationären Wachstumsphase an (Abb. 3.1.7). Der Wert erreichte zu diesem Zeitpunkt einen maximalen Wert von 5214 RLU/OD. Im Verlauf der stationären Wachstumsphase fiel der RLU/OD Wert bis zum Ende der Messreihe kontinuierlich bis zu einem Wert von 1607 RLU/OD ab. Somit konnte gezeigt werden, dass unter den hier verwendeten Bedingungen der Promotor des *comG* Operons mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase bis zum Beginn der stationären Phase aktiv war. Über die Promotoraktivität während der späteren Wachstumsphasen lässt sich keine verlässliche Aussage treffen, da unklar ist, ob der Rückgang der emittierten Lumineszenz auf einer schwächeren Promotoraktivität oder dem Wachstumsphasen-bedingten ATP Mangel beruhte.

Zusammengefasst zeigten die Promotorfragmente von *comK* und *comF* keine Aktivität, womit die Synthese der entsprechenden Proteine ComFA und ComFC, die in *B. subtilis* in ihrer Funktion beim Transport der extrazellulären DNA in die Zelle essentiell für die natürliche Kompetenz sind, wie auch die des Regulators ComK, ausbleibt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass *B. megaterium* bei den hier untersuchten Bedingungen keine natürliche Kompetenz ausbildet.

Jedoch ließ sich unter den verwendeten Bedingungen für das Promotorfragment vom *comG* eine deutliche Aktivität während der gesamten exponentiellen Phase und für das Promotorfragment von *ssbB* eine kurzzeitige Aktivität zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase feststellen.

Bei dem Protein SsbB handelt es sich um ein DNA-bindendes und schützendes Protein. Für Vertreter dieser Proteinklasse wurde bereits mehrfach eine Funktion unabhängig von der natürlichen Kompetenz beschrieben, wobei sie als „Housekeeping Proteine“ zum Schutz von DNA während der Zellteilung fungieren (Johnsborg *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit festgestellte Aktivität des Promotorfragments von *ssbB* zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase könnte mit dieser „Housekeeping Funktion“ korrelieren. Angesichts der erhöhten Zellteilungs- und damit auch DNA-Syntheserate während der exponentiellen Wachstumsphase erscheint es denkbar, dass ein verstärkter Bedarf an SsbB besteht, der durch die Synthese dieses Proteins zu Beginn der Phase abgedeckt wird.

Die in dem *comGABCEFG* Operon codierten Proteine bilden in *B. subtilis* den Pseudopilus, der an der DNA-Aufnahme bei der natürlichen Kompetenz beteiligt ist. Diese Proteine zeigen Homologien zu Komponenten der Typ 4 Pili und des Typ 2 Sekretionssystems (Chen *et al.*, 2006). Für die Typ 4 Pili ist neben der Aufnahme von DNA eine Vielzahl weiterer Funktionen beschrieben (Craig *et al.*, 2004). Dazu gehört neben Motilität und Signaling unter anderem auch Biofilmbildung. Ein wesentlicher Bestandteil von Biofilmen ist extrazelluläre DNA, die als extrazelluläre Matrix dient. Für Typ 4 Pili konnten DNA bindende Eigenschaften erstmals in *S. pneumoniae* direkt nachgewiesen werden (Laurenceau *et al.*, 2013; Muschiol *et al.*, 2015). Diese Eigenschaft der Pili könnte damit sowohl bei der Bildung von Biofilmen als auch bei der DNA-Aufnahme eine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang wurde bereits darüber spekuliert, ob die Aufnahme von DNA durch Typ 4 Pili ein Nebeneffekt der bakteriellen Adhäsion und Motilität ist, bei der DNA durch die Retraktion eines Pilus in die Zelle gezogen wird (Bakkali, 2013). Unabhängig davon kann angesichts der Homologien zwischen den Typ 4 Pili und dem aus den ComG Proteinen bestehenden Pseudopilus darüber spekuliert werden, ob auch der Pseudopilus an anderen Funktionen als der DNA-Aufnahme bei der natürlichen Kompetenz beteiligt ist. So ließe sich die in dieser Arbeit beobachtete Promotoraktivität des *comGABCEFG* Operons in *B. megaterium* DSM-319 erklären. Ohne die übrigen Komponenten des DNA-Aufnahme Apparates könnte der

Pseudopilus in diesem Fall zwar nicht zur Aufnahme von DNA beitragen, könnte aber an anderen Prozessen wie beispielsweise dem Signaling oder Adhäsion beteiligt sein. Das *comGABCDEFG* Operon wäre somit nicht ausschließlich Teil eines möglichen Kompetenzregulons, sondern könnte auch unabhängig von den übrigen späten Kompetenzgenen exprimiert werden.

3.2.3.1. Einfluss verschiedener Medien auf die Promotoraktivität Kompetenz-assoziierter Gene in *Bacillus megaterium* DSM-319

Für andere Bakterienarten konnte gezeigt werden, dass die Induktion der natürlichen Kompetenz unter anderem von dem Kulturmedium abhängig ist (Jarmer *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2014; Jakobs und Meinhardt, 2014). Daher sollte die Promotoraktivität der ausgewählten Gene in unterschiedlichen Medien untersucht werden. Die praktischen Arbeiten hierzu wurden im Wesentlichen im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Patrick Heeger durchgeführt. Als Basismedium diente hierbei das Phosphat-gepufferte Medium SpC, das bei *B. subtilis* zur Induktion der natürlichen Kompetenz führt (Zwei-Schritt Protokoll, Kapitel 3.1.1; Harwood und Cutting, 1991). Das Phosphat-gepufferte Medium wurde entweder unter Zugabe von Glucose, Fructose oder Glucose und Spurenelementlösung (MnCl_2 , FeSO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CoCl_2) zusätzlich zu Hefeextrakt und Casaminosäuren verwendet. Die Kultivierung der *B. megaterium* DSM-319 Plasmidstämme erfolgte ansonsten unter Standardbedingungen bei 37°C und 250 rpm im Erlenmeyerkolben mit Schikane. Die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ und die emittierte Lumineszenz der Kulturen wurde in 30 min-Intervallen im 96-well Format gemessen und die Lumineszenzwerte (RLU: relative light units) gegen die jeweilige $\text{OD}_{600\text{nm}}$ der gemessenen Probe normalisiert (RLU/OD). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.1.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1.1. Übersicht über die Promotoraktivität verschiedener Kompetenz-assoziiierter Gene in *B. megaterium* DSM-319 bei verschiedenen Medienzusammensetzungen. Die Durchführung der Untersuchung erfolgte analog zu den vorherigen Messungen der Promotoraktivität in LB-Medium. *B. megaterium* DSM-319 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und in den angegebene Medien kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm sowie die Lumineszenz wurden im 96-well Format bestimmt. Die gemessenen Lumineszenzwerte (RLU) wurden in Abhängigkeit der jeweiligen OD_{600nm} analysiert (RLU/OD). Die Auswertung der Messungen ist tabellarisch dargestellt. Dabei ist der maximale RLU/OD Wert sowie die Wachstumsphase, zu der dieser gemessen wurde, angegeben. Wenn bei der Kultivierung zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Lumineszenzsignal gemessen wurde, ist dies mit „-“ gekennzeichnet.

Promotorfragment	Medium		
	SpC + Glucose	SpC + Fructose	SpC + Glucose + Spurenelemente
<i>comK</i>	-	-	-
<i>comF</i>	-	-	-
<i>ssbB</i>	-	-	800 RLU/OD Beginn exponentielle Phase
<i>comG</i>	-	-	2200 RLU/OD Ende exponentielle Phase
Ohne Promotor (Negativkontrolle)	-	-	-

Alle Plasmidstämme zeigten in den Medien SpC + Glucose und SpC + Fructose ein schlechteres Wachstum als in LB-Medium. Darüber hinaus konnte in keinem ein signifikant über dem Wert der Negativkontrolle liegendes Lumineszenzsignal festgestellt werden. Dieses trifft auch für die Plasmidstämme zu, bei denen zuvor bei der Kultivierung in LB-Medium eine Promotoraktivität beobachtet werden konnte (*comG* und *ssbB*). Bei der Kultivierung in SpC + Glucose + Spurenelementlösung zeigten sowohl die Plasmidstämme mit dem Promotorfragment von *comG* als auch mit dem von *ssbB* ein Lumineszenzsignal. Der zeitliche Verlauf der Promotoraktivität ähnelte dem der entsprechenden Kultivierung in LB-Medium (Abb. 3.1.6 - 3.1.7). Dabei waren die maximalen Werte mit 2200 RLU/OD (*comG* Promotorfragment) oder mit 800 RLU/OD (*ssbB* Promotorfragment) in etwa vergleichbar zur Kultivierung in LB-Medium. Für die Promotorfragmente von *comF* und *comK* konnte auch bei der Zugabe von Spurenelementen keinerlei Aktivität festgestellt werden. Analog zur Kultivierung in LB-Medium stimmt im Falle der Kultivierung in SpC + Glucose die fehlende Aktivität einiger Promotorfragmente damit überein, dass unter diesen Bedingungen

keine Transformation mittels natürlicher Kompetenz nachweisbar ist, wie durch die Untersuchung der Transformierbarkeit von *B. megaterium* mittels Zwei-Schritt Protokoll gezeigt werden konnte (Kapitel 3.1.).

Insgesamt scheint sich aus dem Vergleich der vier Medien (SpC + Glucose, SpC + Fructose, SpC + Glucose + Spurenelementlösung, LB) ein Trend zur stärkeren Promotoraktivität in komplexeren, reichhaltigeren Medien darzustellen. Es ist jedoch unklar, in wie weit die Medienzusammensetzung möglicherweise die durch die bakterielle Luziferase katalysierte Lumineszenzreaktion beeinflusst. So könnte beispielsweise eine höhere Verfügbarkeit von ATP oder eine insgesamt höhere Proteinbiosyntheserate in den reichhaltigeren Medien zu einem stärkeren Lumineszenzsignal führen.

3.2.4. Untersuchung der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene in den *Bacillus megaterium* Stämmen DSM-319 und MS-941

Die Protoplastentransformation stellt derzeit die Standardmethode zur Transformation von *B. megaterium* dar. Bei vorangegangenen Untersuchungen konnten alle bisher getesteten *B. megaterium* Stämme mittels Protoplastentransformation transformiert werden. Es konnten jedoch Unterschiede hinsichtlich der Transformationseffizienz der verschiedenen Stämme festgestellt werden (persönliche Kommunikation, Dr. Rebekka Biedendieck). Dabei erscheint besonders auffällig, dass Zellen des *B. megaterium* Stammes MS-941 eine höhere Transformationseffizienz als Zellen des Wildtypstammes DSM-319 aufweisen. Bei dem Stamm MS-941 handelt es sich um eine Deletionsmutante des Stammes DSM-319, bei der ein Teil des Gens deletiert wurde, das für die extrazelluläre Protease NprM codiert ($\Delta nprM$), so dass kein funktionelles NprM gebildet wird (Wittchen und Meinhardt, 1995). Da für die extrazelluläre Protease NprM kein Zusammenhang mit der Aufnahme oder Prozessierung von DNA beschrieben ist, liefert der Genotyp dieser Deletionsmutante keine unmittelbare Erklärung für die erhöhte Transformationseffizienz. Auch der genaue Mechanismus der Protoplastentransformation ist bislang nicht bekannt. Eine Möglichkeit hinsichtlich der DNA-Aufnahme wäre, dass die DNA durch Proteinporen in der Zellmembran in die Zelle gelangt. Ein entsprechender Mechanismus wurde bezüglich der chemischen Transformation von *E. coli* beschrieben, bei der die Behandlung mit bivalenten Kationen (z.B. Cl_2) zur verstärkten Produktion der Porine OmpA und OmpC führt. Über diese Poren in der Zellmembran gelangt die extrazelluläre DNA in die Zelle (Aich *et al.*, 2012).

So ist es möglich, dass auch bei der Protoplastentransformation von *B. megaterium* die extrazelluläre DNA über Proteinporen in der Zellmembran in die Zelle gelangt. Die von dem Kompetenz-assoziierten Protein ComEC gebildete Pore stellt eine naheliegende Möglichkeit für diesen Vorgang dar, da die Funktion des DNA Transports in die Zelle für diese Proteinpore bekannt ist. Darüber hinaus könnten auch andere Komponenten des DNA-

Aufnahme Apparates der natürlichen Kompetenz, beispielsweise ComEA für die DNA-Bindung an die Zelle oder die Helikase ComFA für den Transport durch die ComEC-Pore, an der Protoplastentransformation beteiligt sein. Die späten Kompetenzgene bzw. Operons (z.B. *ssbB*, *comEABC*, *comGABCDEFG*, *comFABC*) bilden in *B. subtilis* ein Regulon, dessen Expression bei Ausbildung der natürlichen Kompetenz aktiviert wird. Falls diese späten Kompetenzgene in *B. megaterium* DSM-319 ebenfalls ein Regulon bilden, könnten mehrere dieser codierten Proteine an der Protoplastentransformation beteiligt sein. Die höhere Transformationseffizienz des Stammes MS-941 gegenüber dem Wildtypstamm ließe sich so mit einer stärkeren Expression und dadurch verstärkten Synthese Kompetenz-assoziiierter Proteine erklären. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob Unterschiede hinsichtlich der Promotoraktivität Kompetenz-assoziiierter Gene zwischen den *B. megaterium* Stämmen DSM-319 und MS-941 vorhanden sind.

Die experimentelle Durchführung erfolgte analog zu den vorherigen Untersuchungen in *B. megaterium* DSM-319, indem die selben Reporterplasmide verwendet und mittels Protoplastentransformation in *B. megaterium* MS-941 eingebracht wurden. Die Kultivierung erfolgte zunächst in LB-Medium. Für jeden Plasmidstamm wurden drei unabhängige biologische Replikate vermessen (Abb. 3.1.8 bis 3.1.10).

Das Wachstumsverhalten der MS-941 Plasmidstämme zeigte mit Ausnahme des Stammes, der das Plasmid mit dem Promotorfragment von *comK* upstream des *luxCDABE* Operons enthält (Abb. 3.1.8), ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die entsprechenden Plasmidstämme von *B. megaterium* DSM-319 (Abb. 3.1.5 - 3.1.7). Im Falle des Stammes mit dem Plasmid mit dem *comK* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons ergab sich für DSM-319 eine längere lag-Phase, gefolgt von einem etwas langsameren Wachstum.

Bei dem MS-941 Plasmidstamm mit dem Plasmid der Kontrolle, ohne Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons, lag die RLU/OD zu allen Messpunkten auf einem gleichbleibend geringen Niveau von < 300 RLU/OD, wobei der Wert im Laufe der stationären Wachstumsphase kontinuierlich auf einen Wert von < 100 RLU/OD abfiel (nicht gezeigt). Somit ist auch in dem Stamm MS-941, analog zu DSM-319, nur ein geringes unspezifisches Lumineszenzsignal zu beobachten, so dass alle Werte, die über der hier gemessenen Hintergrundlumineszenz lagen, auf spezifische Effekte der untersuchten Promotofragmente zurückzuführen sein sollten.

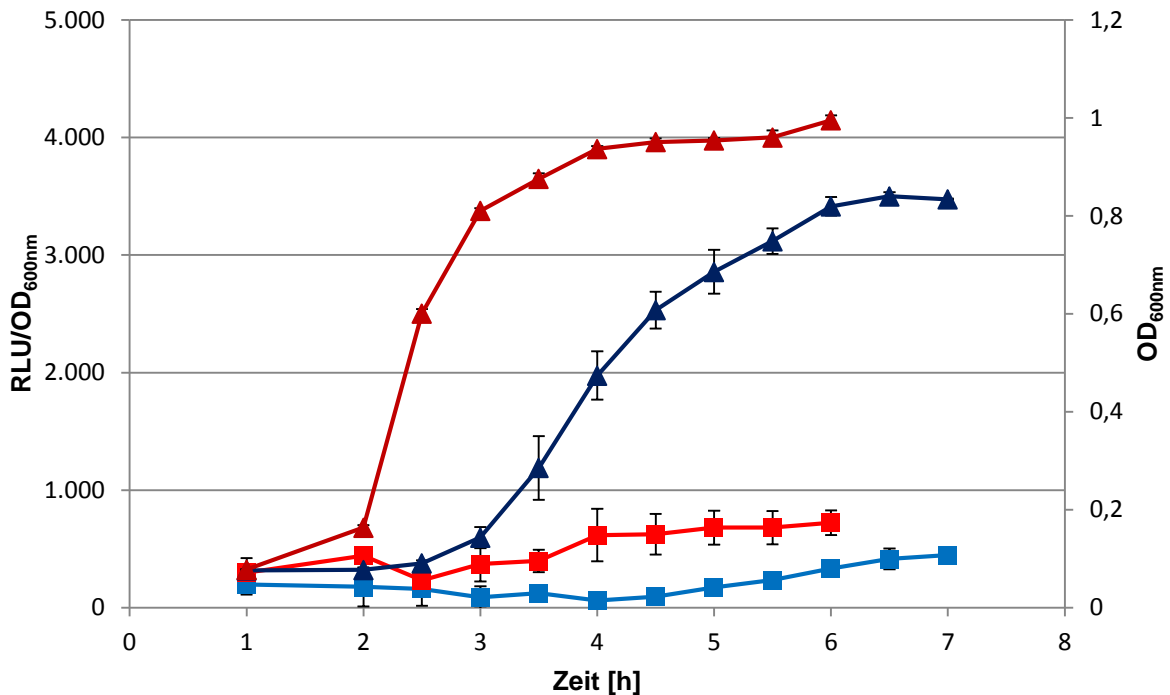


Abbildung 3.1.8. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS941 transformiert mit einem Plasmid mit dem *comK* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 (blaue Graphen) und *B. megaterium* MS941 (rote Graphen) wurden je mit einem Plasmid transformiert, welches das *comK* Promotorfragment (pTKBm13) upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Die Stämme wurden separat in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platerereader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

Bei MS-941, der das Plasmid mit dem *comK* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons enthielt, konnte ab der frühen stationären Wachstumsphase ($t = 3,0$ h) ein RLU/OD Wert von 371 gemessen werden, der somit über dem unspezifischen Hintergrundsignal der Negativkontrolle lag (Abb. 3.1.8). Der RLU/OD Wert stieg während der stationären Wachstumsphase bis zum Ende der Messreihe kontinuierlich auf einen Wert von 724 an und lag zu allen Messpunkten über den Werten die für den Stamm DSM-319 gemessen wurden (Abb. 3.1.5.A). Da für DSM-319 keine über dem Hintergrundsignal liegenden Werte gemessen werden konnten, schien in MS-941 im Gegensatz zu DSM-319 unter den hier verwendeten Bedingungen der Promotor von *comK* während der stationären Wachstumsphase aktiv zu sein, wobei die Aktivität sehr gering war (Abb. 3.1.8).

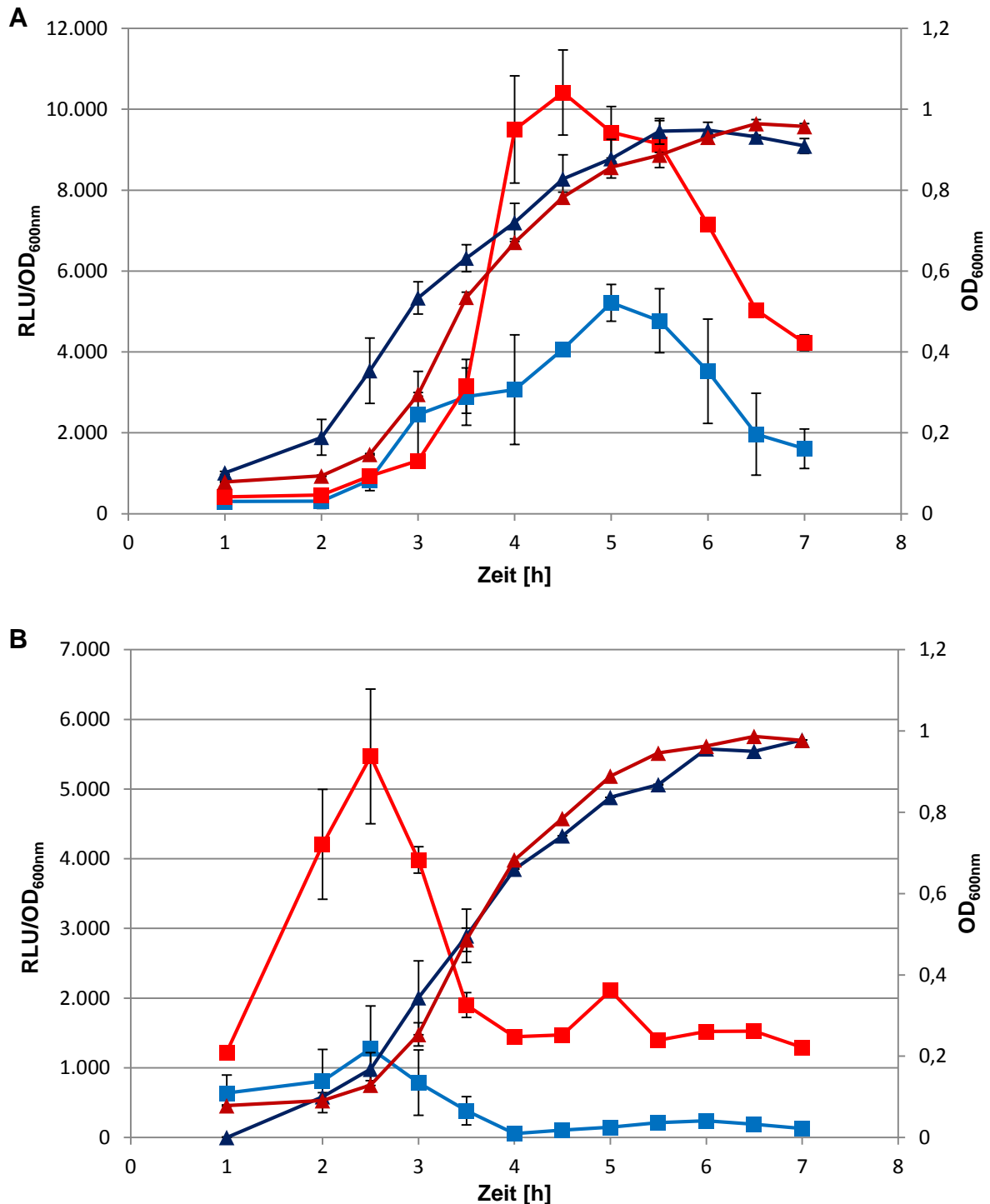


Abbildung 3.1.9. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS941, transformiert mit einem Plasmid mit (A) dem *comG* Promotorfragment bzw. (B) dem *ssbB* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 (blaue Graphen) und *B. megaterium* MS941 (rote Graphen) wurden je mit einem Plasmid transformiert, welches (A) das *comG* Promotorfragment (pTKBm10) bzw. (B) das *ssbB* Promotorfragment (pTKBm12) upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Die Stämme wurden separat in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platerereader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

In MS-941, der entweder das Plasmid mit dem Promotorfragment des *comG* Operons (Abb. 3.1.9.A) oder das Promotorfragment des *ssbB* Gens (Abb. 3.1.9.B) upstream des *luxCDABE* Operons trug, konnten jeweils höhere maximale RLU/OD Werte als in den entsprechenden Plasmidstämmen von DSM-319 gemessen werden. Dabei waren die maximalen RLU/OD Werte bei dem Promotorfragment von *comG* ($t = 4,5$ h) ungefähr zweifach erhöht (5214 RLU/OD vs. 10416 RLU/OD) und für das Promotorfragment von *ssbB* ($t = 2,5$ h) ungefähr vierfach erhöht (1277 RLU/OD vs. 5469 RLU/OD), was eine höhere Promotoraktivität in MS-941 verglichen zu DSM-319 anzeigte.

Das Maximum der RLU/OD Werte lag bei dem Promotorfragment von *comG* jeweils zu Beginn der stationären Phase und bei dem Promotorfragment von *ssbB* zu Beginn der exponentiellen Phase. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Lumineszenzsignale während der Wachstumsphasen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden.

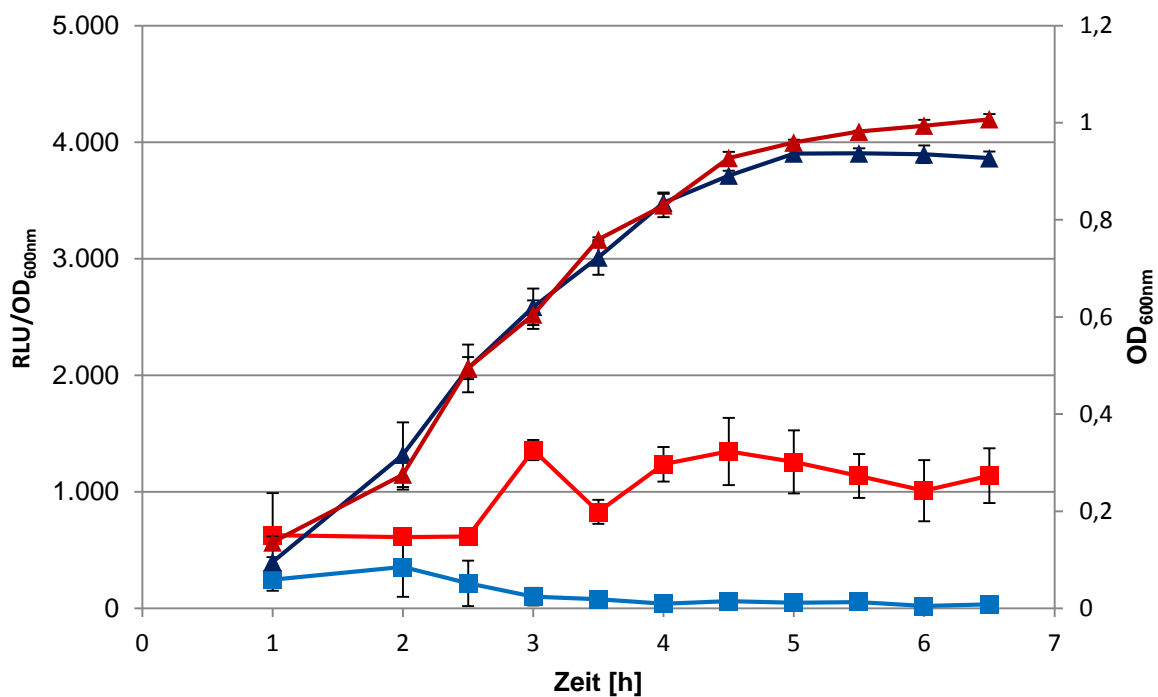


Abbildung 3.1.10. Wachstumskurve und relative Lumineszenz pro OD_{600nm} einer Kultur von *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS941 transformiert mit einem Plasmid mit dem *comF* Promotorfragment upstream des *luxCDABE* Operons. *B. megaterium* DSM-319 (blaue Graphen) und *B. megaterium* MS941 (rote Graphen) wurden je mit einem Plasmid transformiert, welches das *comF* Promotorfragment (pTKBm15) upstream des *luxCDABE* Operons enthält. Die Stämme wurden separat in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (Dreiecke) und die emittierte Lumineszenz wurde alle 30 min im 96-well Format im VarioSkan Platerereader gemessen. In der Abbildung ist die relative Lumineszenz bezogen auf die jeweilige OD_{600nm} (RLU/OD) zu dem Messzeitpunkt dargestellt (Rechtecke). Bei den Werten handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.

Für das Promotorfragment von *comF* upstream des *luxCDABE* Operons konnte in MS-941 ein höherer RLU/OD Wert als in DSM-319 gemessen werden (Abb. 3.1.10). In MS-941 stieg der Wert mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase auf einen Wert von ~1300 RLU/OD und blieb bis zum Ende der Messreihe in der stationären Wachstumsphase auf diesem Niveau, was auf eine Promotoraktivität hindeutet. In DSM-319 konnte zu keinem Messpunkt ein über dem Hintergrundsignal liegender RLU/OD Wert gemessen werden.

Insgesamt konnte für alle untersuchten Promotorfragmente ein höherer Aktivität in MS-941 als in DSM-319 gezeigt werden. Davon ausgehend, dass die hier untersuchte Aktivität der Promotorfragmente mit der Expression der jeweiligen Gene korreliert, scheinen die Kompetenz-assoziierten Gene/Operons *comK*, *comGABCEFG*, *ssbB* und *comFAC* in Abwesenheit der extrazellulären Protease NprM (Stamm MS-941) stärker exprimiert zu werden. Diese Beobachtung stimmt mit der höheren Transformationseffizienz des Stammes MS-941 bei der Protoplastentransformation überein, wobei eine verstärkte Expression der relevanten Gene letztlich zu mehr Proteinen des DNA-Aufnahme-Apparates und damit zu einer besseren Transformation führen könnte.

Hierbei ist vor allem die Expression des *comFAC* Operons und von *comK* von besonderem Interesse. Im Wildtypstamm konnte keine Expression festgestellt werden, wohingegen der Stamm MS-941 eine deutliche Expression zeigte, so dass auch die entsprechenden Proteine vorhanden sein könnten. Im Gegensatz dazu sollten durch die Expression des *comGABCEFG* Operons und von *ssbB* die codierten Proteine in beiden Stämmen produziert werden. Falls für die Protoplastentransformation alle Kompetenz-assoziierten Proteine essentiell sind, ist zunächst unklar, warum sich DSM-319 ohne ComFAC Proteine transformieren lässt. Möglich wäre, dass trotz fehlendem Lumineszenzsignal dennoch eine basale Expression vorhanden ist und somit auch Proteinbiosynthese stattfinden kann. Ebenso könnte eine Expression des *comFAC* Operons von einem Promotor, der nicht in dem hier getesteten Promotorfragment lokalisiert ist, induziert werden. Für *B. subtilis* 168 konnte gezeigt werden, dass Deletionen im *comFABC* Operon zwar die Transformationseffizienz bis 1000-fach verringern, die Stämme jedoch nicht untransformierbar machen (Londoño-Vallejo und Dubnau, 1993). Somit könnte auch *B. megaterium* DSM-319 in Abwesenheit der ComFAC Proteine mit einer geringen Effizienz transformierbar sein, während das Fehlen anderer Proteine jedoch zu einem völligen Verlust der Transformierbarkeit führt (Chen und Dubnau, 2004). Eines dieser für die natürliche Kompetenz essentiellen Proteine ist ComEC, das die Pore in der Zellmembran bildet (Draskovic und Dubnau, 2005). Daher wären Untersuchungen hinsichtlich der Aktivität des *comEABC* Promotorfragments in den beiden Stämmen von großem Interesse. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch kein funktionales Reporterkonstrukt vorlag, kann dazu keine Aussage getroffen werden.

Zusammengefasst zeigen die hier gewonnen Daten, dass die extrazelluläre Protease NprM einen Einfluss auf die Regulation der untersuchten Kompetenz-assoziierten Gene zu haben scheint, wobei NprM reprimierend auf die Expression der späten Kompetenzgene zu wirken scheint. Die molekularen Grundlagen dieses Mechanismus sind zu diesem Zeitpunkt jedoch noch unklar und sollten daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

3.3. Transkriptomanalyse von *Bacillus megaterium* MS-941 im Vergleich zu *Bacillus megaterium* DSM-319

Für *B. megaterium* MS-941 (DSM-319 $\Delta nprM$) konnte eine stärkere Aktivität der untersuchten Promotorfragmente der Kompetenz-assoziierten Gene gezeigt werden als in dem Wildtypstamm *B. megaterium* DSM-319. Auf Genomebene unterscheiden sich die beiden Stämme nur im Vorhandensein der extrazellulären Protease NprM, worauf somit die unterschiedliche Promotoraktivitäten zurückzuführen sein sollten. Für extrazelluläre Proteasen ist bekannt, dass sie Einfluss auf unterschiedliche regulatorische Mechanismen haben können. So können sie beispielsweise beim Quorum-sensing entweder durch proteolytischen Abbau für die Inaktivierung oder aber durch die Prozessierung von Prä-Proteinen zur Aktivierung von Signaling Proteinen führen (Lanigan-Gerdes *et al.*, 2007). Im Rahmen der natürlichen Kompetenz konnte für *S. pneumoniae* gezeigt werden, dass die Aktivität der Zelloberflächen-assoziierten Protease HtrA einen reprimierenden Einfluss auf die Ausbildung der natürlichen Kompetenz hat (Stevens *et al.*, 2011). Es wird spekuliert, dass HtrA ohne Stressbedingungen durch den Abbau eines extrazellulären Signaling Proteins reprimierend auf die regulatorische Signalkaskade innerhalb der Zelle wirkt, so dass die Ausbildung der natürlichen Kompetenz nicht induziert wird. Kommt es nun beispielsweise durch Sekretionsstress oder DNA-Schäden zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, dienen diese statt der Signaling Proteine vermehrt als Substrat für HtrA. So wäre also eine größere Menge an Signaling Proteinen vorhanden, was letztlich zur Induktion der natürlichen Kompetenz führt. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für den beobachteten Effekt der extrazellulären Protease NprM in *B. megaterium* möglich, da auch deren Aktivität scheinbar reprimierend auf die Expression Kompetenz-assoziiierter Gene wirkt (Kapitel 3.2.4).

Um weitere Gene zu identifizieren, die in den beiden Stämmen MS-941 und DSM-319 unterschiedlich stark exprimiert werden, wurde das gesamte Transkriptom der beiden Stämme mittels DNA-Microarray analysiert. Dieses erlaubt eine globale Aussage über die Auswirkung der Deletion von *nprM* auf die Genexpression. Durch die Identifizierung differentiell exprimierter Gene können anhand der physiologischen Funktion der jeweiligen Genprodukte Rückschlüsse auf phänotypische Unterschiede gezogen werden. Weiterhin könnte die Identifizierung von differentiell exprimierten Regulatoren Hinweise auf regulatorische

Mechanismen liefern, über die NprM auf die Genexpression, unter anderem der Kompetenz-assoziierten Gene, wirkt. Dieses würde einen ersten Einblick in die regulatorischen Grundlagen der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* liefern.

Die Analyse des Transkriptoms erfolgte bei den für die Protoplastentransformation verwendeten Bedingungen, da sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Transformationseffizienz der Stämme DSM-319 und MS-941 während der Protoplastentransformation zeigten. Daher wurde angenommen, dass bereits zu diesem Zeitpunkt auf transkriptioneller Ebene Unterschiede bestehen. Die Stämme wurden in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bis zu einer OD_{578nm} von 1 kultiviert, was der frühen exponentiellen Wachstumsphase entspricht und anschließend geerntet. Die Bestimmung der OD_{578nm} erfolgte hierbei mit 1 ml Kultur in einem Photometer. Sie stimmt nicht mit der bei der Untersuchung der Promotoraktivität im 96-well Format mit 200 µl Kultur bestimmten OD_{600nm} überein, was auf die unterschiedliche Schichtdicke der Proben zurückzuführen ist. Anschließend wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert, gereinigt, prozessiert und dann mittels Zwei-Farben-DNA-Microarray analysiert. Dabei wurden ausschließlich die definierten ORFs für *B. megaterium* DSM-319 analysiert, intergenische Regionen wurden nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der Werte erfolgte für jeden Stamm mit vier unabhängigen biologischen Replikaten. In der Tabelle 3.1.2 sind alle Gene dargestellt, deren Expression zwischen den beiden Stämmen mindestens um den Faktor 2 differierten (FC > +/-2; Foldchange). Dabei diente DSM-319 als Basis, mit dem der Stamm MS-941 verglichen wurde. Somit waren bei positiven Foldchange-Werten die Gene in *B. megaterium* MS-941 stärker und bei negativen Werten schwächer als in *B. megaterium* DSM-319 exprimiert.

Tabelle 3.1.2. Liste der in *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS-941 unterschiedlich exprimierten Gene. Das Transkriptom der Stämme *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS-941 wurde mittels Zwei-Farben-DNA-Microarray analysiert. Verglichen wurde die Stärke der Genexpression aller annotierter ORFs des Stammes MS-941 bezogen auf den Stamm DSM-319. Die Stämme wurden in vier unabhängigen biologischen Replikaten in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm in Schüttelkolben mit Schikane kultiviert. Die Probennahme erfolgte bei einer OD_{578nm} von 1 (frühe exponentielle Phase). Dargestellt sind alle Gene, deren Expression sich in den beiden Stämmen um einen Faktor von $> \pm 2$ (FC; Foldchange $> \pm 2$) unterschied. Der obere Teil der Tabelle zeigt Gene, die in *B. megaterium* MS-941 stärker exprimiert wurden als in *B. megaterium* DSM-319 (oberhalb des Trennbalkens), der untere Teil zeigt Gene, die schwächer exprimiert wurden (unterhalb des Trennbalkens). Den Genen wurde mittels Gene Ontology eine physiologische Funktion zugeordnet. Die Funktion ist als Nummer angegeben. Die zugehörigen Funktionen zu den Nummern sind: **1:** Aminosäure Biosynthese; **2:** Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen, Transportern und Vitaminen; **3:** Zellmembran/Zellwand; **4:** Zelluläre Prozesse; **5:** Zentraler intermediärer Metabolismus; **6:** Energiemetabolismus; **7:** Proteinprozessierung; **8:** Proteinbiosynthese; **9:** Purine, Pyrimidine, Nukleoside und Nukleotide; **10:** Regulatorische Funktionen; **11:** Transport und bindende Proteine; **12:** Uncharakterisierte Funktion - Hypothetische Proteine.

Genlokus	Name	Beschreibung	Gene Ontology	FC
BMD_5114		flotillin-like protein	12	5,69
BMD_1035		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase cwL (Cell wall hydrolase) (Autolysin)	3	5,68
BMD_0821	<i>yknZ</i>	putative ABC transporter, permease protein	11	4,61
BMD_4238	<i>pyrD</i>	dihydroorotate dehydrogenase, catalytic subunit	9	4,02
BMD_4239	<i>pyrK</i>	dihydroorotate dehydrogenase, electron transfer subunit	9	3,89
BMD_4236	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	9	3,83
BMD_0819		efflux transporter, RND family, MFP subunit	11	3,79
BMD_5113		conserved hypothetical protein	12	3,78
BMD_4237	<i>pyrF</i>	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	9	3,72
BMD_4543		conserved hypothetical protein	12	3,60
BMD_0820	<i>yknY</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein	11	3,52
BMD_3677		multidrug resistance protein, SMR family	4	3,52
BMD_1098	<i>hag</i>	flagellin	3	3,50
BMD_4542		conserved hypothetical protein	12	3,50
BMD_0818		conserved hypothetical protein	12	3,41
BMD_5086		sigma 54 modulation protein/S30EA ribosomal protein	8	3,39
BMD_0069	<i>ctc</i>	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	8	3,28
BMD_4240	<i>pyrAB</i>	carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	9	3,27
BMD_0521		conserved hypothetical protein	12	3,26
BMD_2856		M23/M37 peptidase domain protein	7	3,25
BMD_1153	<i>wprA</i>	cell wall-associated (serine) protease	7	3,25
BMD_1103		conserved hypothetical protein	12	3,12
BMD_3174		LPXTG-motif cell wall anchor domain protein	3	3,06
BMD_3797		protein of unknown function (UPF0005)	12	3,02
BMD_4632		conserved hypothetical protein	12	3,00
BMD_3837		hypothetical protein	12	2,75
BMD_3841		hypothetical protein	12	2,74
BMD_4241	<i>pyrAA</i>	carbamoyl-phosphate synthase, small subunit	9	2,70
BMD_2039		conserved hypothetical protein	3	2,66
BMD_3679		hypothetical protein	12	2,65

Genlokus	Name	Beschreibung	Gene Ontology	FC
BMD_4544		putative membrane protein	12	2,65
BMD_3839		acetyltransferase GNAT family	12	2,56
BMD_1926		Helix-turn-helix domain of resolvase	12	2,54
BMD_0186		hypothetical protein	12	2,52
BMD_4014		hypothetical protein	12	2,48
BMD_1097		conserved hypothetical protein	12	2,47
BMD_3676		transcriptional regulator, TetR family	10	2,42
BMD_3550		putative protease, NlpC/P60 family	7	2,40
BMD_3678	<i>yvaD</i>	putative membrane protein YvaD	12	2,37
BMD_3362		conserved hypothetical protein	12	2,35
BMD_1036		hypothetical protein	12	2,34
BMD_3842		hypothetical protein	12	2,34
BMD_3838		conserved hypothetical protein	12	2,31
BMD_3145		hypothetical protein	12	2,29
BMD_4015	<i>spo0M</i>	sporulation-control protein Spo0M	4	2,28
BMD_4298	<i>qcrA</i>	menaquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	6	2,26
BMD_0368		intracellular protease, Pfpl family	7	2,24
BMD_4016	<i>prkC</i>	serine/threonine protein kinase	4	2,23
BMD_4242	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	9	2,13
BMD_4017		hypothetical protein	12	2,13
BMD_2443		hypothetical protein	12	2,13
BMD_2038		conserved hypothetical protein	12	2,10
BMD_1096		putative peptidoglycan binding domain protein	3	2,06
BMD_3436		HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIB	12	2,05
BMD_0582	<i>prsA</i>	foldase protein PrsA	7	2,05
BMD_4485		conserved hypothetical protein	12	2,05
BMD_2753		hypothetical protein	12	2,03
BMD_0581		conserved hypothetical protein	12	2,02
BMD_1004	<i>capC</i>	capsule biosynthesis protein CapC	4	-2,01
BMD_1006		putative gamma glutamyl transferase	7	-2,08
BMD_0890		6-phospho 3-hexuloisomerase domain protein	6	-2,10
BMD_1005	<i>capA</i>	capsule biosynthesis protein CapA	4	-2,14
BMD_0370	<i>ade</i>	adenine deaminase	9	-2,19
BMD_4914	<i>sirA</i>	uroporphyrin-III C-methyltransferase	2	-2,21
BMD_1003	<i>capB</i>	capsule biosynthesis protein CapB	4	-2,30
BMD_4916	<i>sat</i>	sulfate adenylyltransferase	5	-2,38
BMD_0891	<i>hxlA</i>	3-hexulose-6-phosphate synthase	6	-2,45
BMD_3147		hypothetical protein	12	-2,46
BMD_4915	<i>cysC</i>	adenylylsulfate kinase	5	-2,47
BMD_4917	<i>cysP</i>	sulfate permease	11	-2,61
BMD_2012	<i>dtpT</i>	amino acid/peptide transporter (Peptide:H ⁺ symporter)	11	-2,71
BMD_3891	<i>argI</i>	arginase	1	-3,79
BMD_1974	<i>abrB</i>	transition state regulatory protein abrB	10	-4,08
BMD_0662	<i>rocA</i>	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	6	-4,61
BMD_0663	<i>rocD</i>	ornithine--oxo-acid transaminase	6	-4,73
BMD_0054	<i>abrB</i>	transition state regulatory protein AbrB	10	-13,76

Insgesamt konnten mittels DNA-Microarray Transkriptomanalyse 76 Gene identifiziert werden, deren Expression sich zwischen den Stämmen DSM-319 und MS-941 mindestens um den Faktor 2 (negativ oder positiv) unterschied. Hiervon waren 58 Gene im Stamm MS-941 stärker und 18 Gene schwächer exprimiert als in DSM-319.

Die Unterschiede in der Stärke der Genexpression lagen zwischen einem Faktor von +5,69 (BMD_5114) und -13,76 (BMD_0054). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Stämme *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS-941 nicht ausschließlich in dem Vorhandensein der extrazellulären Protease NprM unterscheiden. Auf Grund der unterschiedlich exprimierten Gene sind weitere Unterschiede im Phänotyp der beiden Stämme zu erwarten. Somit kann der extrazellulären Protease NprM ein direkter oder indirekter Effekt auf die Genexpression der Zelle zugeordnet werden.

Zur weiteren Analyse der als unterschiedlich exprimiert identifizierten Gene wurden diese ihrer physiologischen Funktion nach gruppiert (mittels „Gene Ontology“; Ashburner *et al.*, 2000). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.1.13 dargestellt.

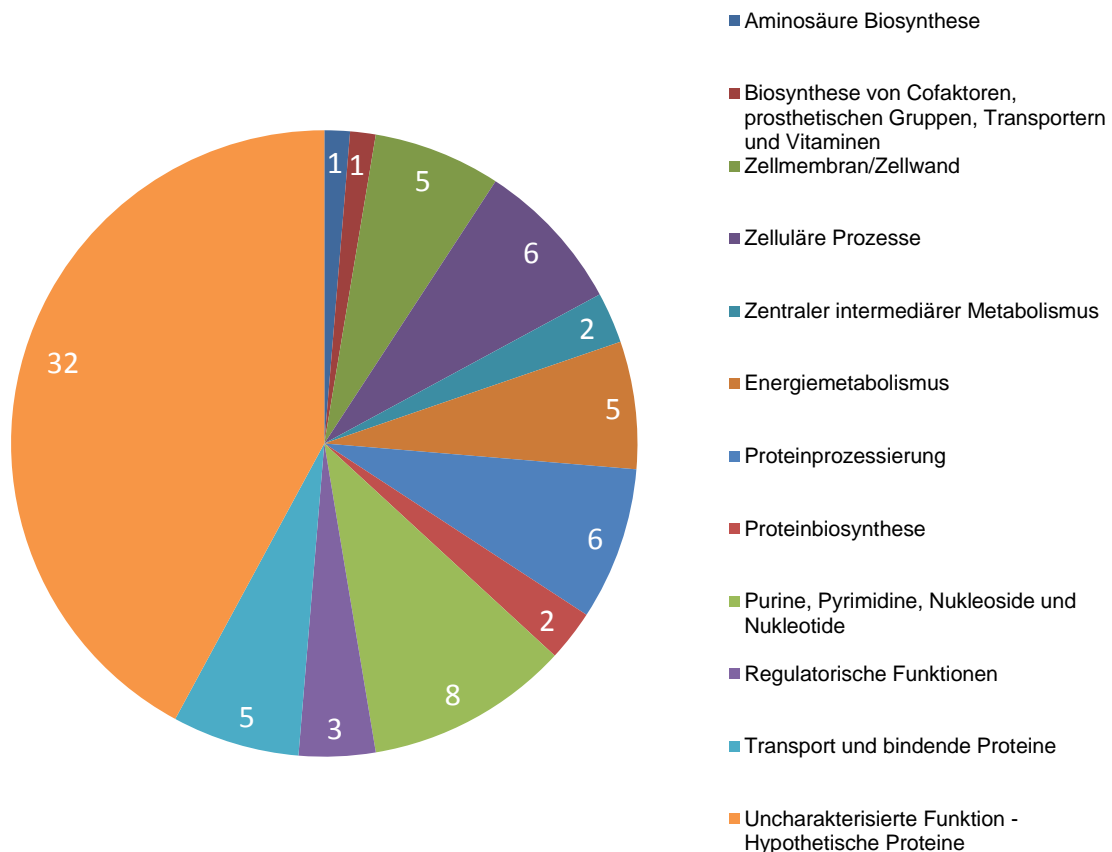


Abbildung 3.1.13. Einordnung der in *B. megaterium* DSM-319 und *B. megaterium* MS-941 differentiell exprimierten Gene nach der physiologischen Funktion ihrer Genprodukte. Allen Genen, deren Expression sich bei der Transkriptomanalyse aller ORFs in DSM-319 und MS-941 um einen Faktor $> \pm 2$ unterschied, wurden an Hand ihrer Gene Ontology Annotierung eine (primäre) physiologische Funktion zugewiesen. Pro Gen wurde jeweils nur eine (primäre) physiologische Funktion zugewiesen. Dargestellt ist die Anzahl der Gene pro Kategorie einer physiologischen Funktion.

Für 32 der insgesamt 76 Gene (~42%) konnte keine physiologische Funktion zugeordnet werden (Uncharakterisierte Proteine – Hypothetische Proteine). Die übrigen Gene konnten 12 verschiedenen physiologischen Funktionen zugeordnet werden (Abb. 3.1.13), wobei zwischen 1 und 8 Genen zu den jeweiligen Gruppen gehörten. Es konnte somit anhand dieser Analyse keine dominante physiologische Funktion identifiziert werden, die zwischen den beiden Stämmen DSM-319 und MS-941 unterschiedlich ausgeprägt ist. Das in MS-941 teilweise deletierte Gen *nprM* (Wittchen und Meinhardt, 1995) wurde nicht als unterschiedlich exprimiert identifiziert, da die im DNA-Microarray verwendeten DNA-Sonden (60 nt), die zur Identifizierung der jeweiligen Transkripte dienen, komplementär zu dem im Genom verbliebenden Fragment des *nprM* Gens sind, das weiterhin transkribiert wird.

Bei den Transkriptomanalysen wurden keine Kompetenz-assoziierten Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert identifiziert. Sollten die unterschiedliche Transformationseffizienz zwischen den beiden Stämmen auf Komponenten des DNA-Aufnahme Apparates beruhen, wäre ein Unterschied in deren Genexpression zu erwarten. Dieses lassen auch die Aktivitätsstudien der Promotofragmente der Kompetenz-assoziierten Gene vermuten. Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Unterschiede bei der Transkriptomanalyse könnte sich durch eine Kulturheterogenität in *B. megaterium* ergeben. Dieses Phänomen ist für *B. subtilis* hinlänglich beschrieben, bei dem ~10% einer Kultur natürliche Kompetenz ausbilden (Hajjema *et al.*, 2001). Bei der Transkriptomanalyse wurde die Gesamt-RNA der Kultur analysiert. Sollte auch bei den beiden *B. megaterium* Stämmen DSM-319 und MS-941 nur in 10% der Zellen eine unterschiedliche Expression der Kompetenz-assoziierten Gene stattfinden, sind die relativen Unterschiede auf die gesamte Kultur bezogen stark verringert. In der Transkriptomanalyse würden diese Gene somit nicht als signifikant differentiell exprimiert erkannt werden. Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben bereits Hinweise auf eine Kulturheterogenität bei der Promotoraktivität der Kompetenz-assoziierten Gene in *B. megaterium* DSM-319 und MS-941 geliefert, was der obige Hypothese entsprechen würde. Für diese Untersuchungen wurden Plasmid-basiert transkriptionelle Fusionen der Promotorfragmente mit *gfp* als Reporter erstellt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei konnte in beiden Stämmen ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität verschiedener Zellen einer Kultur beobachtet werden, wobei jeweils in einem Teil der Zellen keine Fluoreszenz sichtbar war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der größte Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Stämmen konnte für das Gen *abrB* (BMD_0054; GenBank: ADF37000.1) bestimmt werden. Die Expression ist in MS-941 um den Faktor 13,76 geringer als im Wildtypstamm DSM-319. Das Protein AbrB wurde in *B. subtilis* und anderen Arten der Gattung *Bacillus* als globaler Regulator der Genexpression identifiziert (Chumsakul *et al.*, 2011; Jakobs *et al.*, 2014; Lozano Goné *et al.*, 2014). Es reprimiert dort die Expression einer Vielzahl von Genen während der

exponentiellen Wachstumsphase. Beim Übergang in die Stationärphase kommt es dann zu einer Reprimierung der Expression von *abrB*, so dass es in der Folge zu einer Derepression der zuvor reprimierten Gene kommt. Das Protein AbrB reguliert so die Expression von mehr als 100 Genen, die unter anderem in der Biofilmbildung, Antibiotikaproduktion, Motilität, Synthese extrazellulärer Proteine, Sporulation und auch der Ausbildung der natürlichen Kompetenz involviert sind (Chumsakul *et al.*, 2011). Die Vielzahl der verschiedenen zellulären Prozesse, die durch AbrB reguliert werden, verdeutlicht seine Bedeutung als globaler Regulator. Auf Grund seiner bekannten Regulation der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* kann spekuliert werden, dass AbrB auch in *B. megaterium* an der Regulation Kompetenz-assoziiierter Gene beteiligt ist. Die verringerte Expression von *abrB* und die damit verbundene geringere Menge an AbrB in *B. megaterium* MS-941 könnte zu einer Derepression der späten Kompetenzgene in einigen Zellen führen. Dieses stünde im Einklang mit der höheren Aktivität der untersuchten Promotorfragmente sowie der höheren Transformationseffizienz in *B. megaterium* MS-941. Für die Expression von *abrB* selbst konnte unter anderem ein Einfluss des Spo0A Phosphorelay Systems festgestellt werden (Hahn und Roggiani, 1995). Dieses System wird wiederum durch Sensorkinasen von Zwei-Komponenten-Systemen beeinflusst (Banse *et al.*, 2011), wodurch sich ein Zusammenhang von der *abrB* Expression zu extrazellulären Signalen und Quorum-sensing Systemen ergibt. Über den Mechanismus des Quorum-sensing ließe sich letztlich die Wirkung der extrazellulären Protease NprM auf den globalen Regulator AbrB erklären, indem es, ähnlich wie HtrA in *S. pneumoniae*, an dem Abbau oder der Prozessierung von Signaling Proteinen beteiligt ist. Neben den Unterschieden bei der Expression Kompetenz-assoziiierter Gene lässt die differentielle Regulation von *abrB* auf Grund der Eigenschaft des Genprodukts AbrB als globaler Regulator auf Differenzen bei einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse zwischen den Stämmen DSM-319 und MS-941 schließen. Es sind also weitere phänotypische Unterschiede zu erwarten.

Das Gen BMD_5114, dessen Expression in MS-941 im Vergleich zu DSM-319 mit einem Faktor von 5,69 am stärksten exprimiert wurde, codiert für ein „flotillin-like protein“. Flotilline sind Proteine, die in der Zellmembran von Bakterien lokalisiert sind. Analog zu den „Lipid-rafts“ in Eukaryoten scheinen sie an der Ausbildung von Mikrodomänen in der bakteriellen Zellmembran beteiligt zu sein. Diese Mikrodomänen erlauben eine Akkumulation einzelner Proteine zu Proteinkomplexen in der Zellmembran, die für spezifische Funktionen erforderlich sind. Flotilline sind auf diese Weise an zellulären Vorgängen wie der Sekretion von Proteinen, dem Zellwandmetabolismus, Transportvorgängen und Signaling-Vorgängen beteiligt (Donovan und Bramkamp, 2009; Dempwolff *et al.*, 2012; Bach und Bramkamp, 2013). In *B. subtilis* konnte für das „flotillin-like protein“ YuaG eine Beteiligung am Prozess der Sporulation gezeigt werden, wobei es wahrscheinlich eine Rolle bei der Signalkaskade

spielt (Donovan und Bramkamp, 2009). Die regulatorischen Mechanismen der Sporulation in *B. subtilis* überschneiden sich in vielen Bereichen mit der Regulation der natürlichen Kompetenz (Hamoen, 2003). Somit ist es denkbar, dass auch die Ausbildung der natürlichen Kompetenz durch Flotilline beeinflusst wird. Die stärkere Expression des für das „flotillin-like protein“ codierenden Gens in MS-941 könnte daher eine weitere Erklärung für die stärkere Aktivität der untersuchten Promotorfragmente der Kompetenz-assoziierten Gene darstellen. Die differentielle Expression von *abrB* und des für das „flotillin-like protein“ codierenden Gens liefern eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Transformationseffizienzen und die Unterschiede in der Expression Kompetenz-assoziiierter Gene zwischen den Stämmen DSM-319 und deren $\Delta nprM$ -Mutante MS-941. Auf Grund der globalen regulatorischen Bedeutung der entsprechenden Genprodukte sind weitere phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu erwarten, wobei auch die Genprodukte der übrigen 74 differentiell exprimierten Gene direkt oder indirekt Einfluss auf die Regulation zellulärer Prozesse haben können. Eindeutige Aussagen über den Zusammenhang zwischen dem Fehlen der funktionellen extrazellulären Protease NprM und den Unterschieden in der Genexpression lassen sich an dieser Stelle nicht treffen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass, bedingt durch die Deletion des für die extrazellulären Protease NprM codierenden Gens *nprM*, auf Transkriptom-Ebene ein größerer Unterschied zwischen den *B. megaterium* Stämmen DSM-319 und MS-941 besteht als bisher angenommen, was bei künftigen Arbeiten und Ergebnisinterpretationen berücksichtigt werden muss.

3.4. Untersuchung des Proteins ComK aus *Bacillus megaterium*

In *B. subtilis* konnte das Protein ComK (ComK_{Bsub}) als zentraler Regulator der natürlichen Kompetenz identifiziert werden. Bei Genomanalysen des *B. megaterium* Stamms DSM-319 wurde ein Gen gefunden, das für ein homologes Protein zu ComK_{Bsub} codiert. Dieses Protein ComK aus *B. megaterium* (ComK_{Bmeg}, 159 Aminosäuren) weist im Vergleich zu ComK_{Bsub} aus *B. subtilis* Stamm 168 (192 Aminosäuren) einen „E-value“ von 4×10^{-8} auf, mit 25,52 % identischen und 47 % ähnlichen Aminosäuren (Gamer, 2010). Über die biologische Funktion von ComK_{Bmeg} ist derzeit wenig bekannt. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass ComK_{Bmeg} in *B. megaterium* im Gegensatz zu ComK_{Bsub} in *B. subtilis* nicht als zentraler Regulator der natürlichen Kompetenz fungiert (Gamer, 2010). Um mehr über die Funktion von ComK_{Bmeg} herauszufinden, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Protein rekombinant in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt werden. Im Folgenden sollten mit Protein-DNA-Bindestudien Hinweise auf die biologische Funktion von ComK_{Bmeg} gewonnen werden. Diese Arbeiten wurde in Teilen im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Sarah Wienecke durchgeführt (Wienecke, 2012).

3.4.1. Sequenzanalyse von ComK_{Bmeg} im Vergleich zu ComK_{Bsub}

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von ComK_{Bsub} und ComK_{Bmeg} lässt sich ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Proteinen feststellen. Das Protein ComK_{Bmeg} ist gegenüber ComK_{Bsub} C-terminal um 30 Aminosäuren verkürzt. Damit zeigt ComK_{Bmeg} eine höhere Homologie zu dem Protein ComK2 aus *Bacillus cereus* ATCC 14579 und ComK2 aus *Staphylococcus aureus subsp. aureus* N315 als zu ComK_{Bsub} (Abb. 3.4.1). Zusätzlich zu den ComK2 Proteinen codiert *B. cereus* ATCC 14579 wie auch *S. aureus subsp. aureus* N315 jeweils das Protein ComK1 (für die „NCBI Reference Sequence“-Kennung der Proteine siehe Beschriftung Abb. 3.4.1). Diese ComK1 Proteine weisen wiederum eine höhere Homologie zu ComK_{Bsub} als zu ComK_{Bmeg} auf. Das Protein ComK_{Bmeg} lässt sich also den ComK2 und ComK_{Bsub} den ComK1 Proteinen zuordnen. In den Bakterienarten mit beiden ComK Proteinen beeinflusst ComK1/ComK_{Bsub} die Expression anderer Gene als ComK2 (Mirończuk *et al.*, 2011; Fagerlund *et al.*, 2014). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Proteine jeweils unterschiedliche DNA-Bindesequenzen erkennen und daher die Expression verschiedener Gene regulieren. Da über die Bindesequenz der ComK2 Proteine derzeit nichts bekannt ist, kann hierüber bislang noch keine weitere Aussage getroffen werden. Auch über die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren der ComK1 Proteine liegen derzeit keine Informationen vor und erlauben daher auch keinen Rückschluss auf die ComK2 Proteine.

Hinsichtlich des Fehlens der C-terminalen Region bei den ComK2 Proteinen lässt sich über einen weiteren Unterschied in der Funktion der ComK1/ComK_{Bsub} und ComK2/ComK_{Bmeg} Proteine spekulieren. Für ComK_{Bsub} konnte gezeigt werden, dass dessen C-terminale Region für eine Oligomerisierung mehrere ComK_{Bsub} Proteine zu Tetrameren verantwortlich ist (Susanna *et al.*, 2007). Diese Bildung von Tetrameren wiederum ist im Falle von ComK_{Bsub} essentiell für die Induktion der Genexpression (Susanna *et al.*, 2004). Hierfür wurde ein Modell postuliert, bei dem die Oligomerisierung mehrere ComK_{Bsub} Proteine an der DNA zu einer Biegung der DNA führt. Der so gebildete DNA-Loop stabilisiert die Bindung der RNA-Polymerase und ermöglicht so die Genexpression. Bei ComK2 könnte daher das Fehlen des C-Terminus dazu führen, dass die ComK2 Proteine nicht oligomerisieren, wodurch die Bildung eines DNA-Loops ausbleibt und daher keine Genexpression stattfindet. Aus dieser Hypothese ergibt sich die Möglichkeit, dass ComK1 und ComK2 antagonistische Funktionen ausüben. Falls ComK2 an dieselbe DNA-Sequenz bindet wie ComK1, käme es zu einer Konkurrenz um die Bindestellen zwischen den beiden Proteinen. Bei der Bindung von ComK1 käme es zu der Induktion der Genexpression, während eine Bindung von ComK2 diese Bindestellen für ComK1 unzugänglich machen und somit zu einer Reprimierung/Inhibierung der Genexpression führen würde.

Da ComK_{Bmeg} eher den ComK2 Proteinen zugeordnet werden kann (Abb. 3.4.1), ist davon auszugehen, dass es in *B. megaterium* nicht die gleiche Funktion wie ComK_{Bsub} in *B. subtilis* ausübt. Dieses korreliert mit den bisherigen Beobachtungen, dass ComK_{Bmeg} nicht der alleinige, zentrale Regulator der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* ist (Gamer, 2010). ComK2 Proteine konnten auch in einer Reihe weiterer *Bacillus* Arten wie *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus weihenstephanensis* identifiziert werden. Jedoch ist derzeit nichts über die Funktion der Proteine in diesen Organismen bekannt (Kovács *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu allen bisher sequenzierten *B. megaterium* Stämmen konnte in diesen Arten zusätzlich ein ComK1 Protein identifiziert werden. Diese Feststellung zeigt wiederum, dass vor allem bezüglich der natürlichen Kompetenz deutliche Unterschiede bei den regulatorischen Mechanismen zwischen *B. megaterium* und anderen Arten der Gattung *Bacillus* zu erwarten sind. Ergebnisse aus anderen Arten können daher wahrscheinlich nur in geringem Maße direkt auf *B. megaterium* bezogen werden.

```

ComK2_ S. aureus      -----MQDNSTKYLLYIQ-----TATSNHLETNCV-FLHCDYI
ComK2_ B. cereus      -----MNDENNI I I S S S T M M I V P Y N H P Y ---YRTKLIDSSGNHLYSCQTA
ComK_ B. megaterium   -----MTNDEKYQIGLTTKALIPVNDPI---HRTKVLDTAGEYMLS-KTC
ComK_ B. subtilis     MSQKTDAPLESYEYVNGATI AVLPEEID-GK-ICSKIEEKDCV-FYVNMKP
ComK1_ B. cereus      MESKVERYVENYVVTKNTMALLPVILSEKK-IVTRVVMNDS-FFVFQKP
ComK1_ S. aureus      -----MYSQNIYVIRKGMVIRPAFDDDDQRNGSEIIRFDKTRIQNPFKV

ComK2_ S. aureus      LKVPINKIVSYAKLHL-SSQSVLIE TAKNINL NKLVEIYINPK--TIL
ComK2_ B. cereus      L-----QLIQKSCLTNIHSTYQGRNAVKT KFKFKQNVPIPNHREYICA
ComK_ B. megaterium   K-----QLLEEACIQEL-STFKGSIAAVRKMFPYKQLTELVINRSQAI IA
ComK_ B. subtilis     L-----QIVDRSCRFFG-SSYAGRKAGTYEVT KISHKPPIMVDESNQIFL
ComK1_ B. cereus      L-----DI I ERSCKRHG-SSFLGRKEG TKELTHITHKAPIATSEADQLYF
ComK1_ S. aureus      Q-----KI I ERSCKFYG-NTYLGKKAETNRITGISSKPPILLTELFPTYF

ComK2_ S. aureus      FPLKHKRAPIQIYINAHYIVGM---TAI-ENSTLIHFQEGIQLEVDEPF S
ComK2_ B. cereus      FPTESPASPNCIWLFFKHVHTIEFFKAK--RAKIHESNGATVTIQISPH
ComK_ B. megaterium   FPTSSPNDYSCAWIFASHVHTSHTLATVHSSSMLIHEKDGTFIPVKLSYY
ComK_ B. subtilis     FPTLSSTRPQCGWISHVHV---KEFKATEFDDTEVTFESNGKTMELPISYN
ComK1_ B. cereus      FPTYSYSRKECAWL SHFYI---ESNKELKDGNLITREINGFAVKLEISK T
ComK1_ S. aureus      FPTHS DRQENIWLNMHYI---ESIKELKNRKCKVTEINNESIILHVSYH

ComK2_ S. aureus      LVSKKCHESLALKHFIENTISN-----
ComK2_ B. cereus      KLSQQLWKAGYVLSQMNMQDSSP-----
ComK_ B. megaterium   SLEKKLARA AAVIRN---YCLESPVVLA-----
ComK_ B. subtilis     SFENQVYRTAWLR TKFQ--DRIDHRVP-----KRQEFMLYPKEERTKM
ComK1_ B. cereus      SFENQQRNTAKLRTEYE--DRRKQGNPCFKEVDKKEESTLRPAYESVYF
ComK1_ S. aureus      SLWHOYNNSIFYYMV DQSRMISKNPDQPIDYNK-ATLNVFEALTRYSL

ComK2_ S. aureus      -----
ComK2_ B. cereus      -----
ComK_ B. megaterium   -----
ComK_ B. subtilis     IYDFILRELGERY
ComK1_ B. cereus      -----VKEGEV-
ComK1_ S. aureus      -----FEDK---

```

Abbildung 3.4.1: Sequenzanalyse („multiple sequence alignment“) der Proteine ComK2 (aus *S. aureus subsp. aureus* N315), ComK2 (aus *B. cereus* ATCC 14579), ComK_{Bmeg} (aus *B. megaterium* DSM-319), ComK_{Bsub} (aus *B. subtilis* 168), ComK1 (aus *B. cereus* ATCC 14579) und ComK1 (aus *S. aureus subsp. aureus* N315). Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden der „NCBI Protein Database“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) entnommen. Die Proteine sind dort mit folgenden „NCBI Reference Sequence“-Kennungen hinterlegt: ComK2_ S. aureus: NP_374885.1; ComK2_ B. cereus: NP_834913.1; ComK_ B. megaterium: YP_003596348.1; ComK_ B. subtilis: NP_388923.1; ComK1_ B. cereus: NP_830920.1; ComK1_ S. aureus: NP_374146.1. Die Aminosäuresequenzen wurden mit dem Web-basierten Programm „Clustal Omega“ analysiert (Version 1.2.1; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Sievers *et al.*, 2014)). Aminosäuren, die in allen sechs ComK Proteinen konserviert sind, sind rot hinterlegt. Aminosäuren, die mindestens in allen ComK Proteinen aus den *Bacillus* Spezies konserviert sind, sind hellblau hinterlegt. Aminosäuren, die in allen ComK Proteinen des ComK2-Typs (ComK_ B. megaterium, ComK2_ B. cereus, ComK2_ S. aureus) konserviert sind, sind grün hinterlegt. Aminosäuren, die mindestens in allen ComK Proteinen des ComK1-Typs (ComK_ B. subtilis, ComK1_ B. cereus, ComK1_ S. aureus) konserviert sind, sind pink hinterlegt. Der C-terminale Teil, der nur bei ComK_ B. subtilis und den ComK1 Proteinen zu finden ist, ist in roter Schrift dargestellt.

3.4.2. Rekombinante Produktion von ComK_{Bmeg} in *Escherichia coli*

Das Protein ComK_{Bmeg} sollte in *E. coli* intrazellulär produziert und anschließend affinitätschromatographisch gereinigt werden. Für ComK_{Bsub} wurde gezeigt, dass sich die Fusion mit einem 6x Histidin-Affinitätstag negativ auf die Eigenschaften des Proteins auswirkt. So führte ein N-terminaler His-Affinitätstag an ComK_{Bsub} *in vivo* zu einer geringeren Induktion der Genexpression des *comGABCDEFGG* Operons als bei ComK_{Bsub} ohne Tag. Außerdem konnte ein His-ComK_{Bsub} Fusionsprotein nur in denaturierter Form an das Affinitätsmaterial binden, was darauf hindeutet, dass der His-Tag nicht frei zugänglich ist (Susanna *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu dem 6x Histidin-Tag konnte ComK_{Bsub} mit einem MBP-Tag (maltose binding protein) erfolgreich in *E. coli* produziert und gereinigt werden (Hamoen *et al.*, 1998; Susanna *et al.*, 2006; Susanna *et al.*, 2007), weshalb auch ComK_{Bmeg} als Fusionsprotein mit dem MBP produziert und gereinigt werden sollte.

3.4.2.1. Produktion von ComK_{Bmeg} mit MBP

Bei dem „maltose binding protein“ (MBP) handelt es sich um ein Protein aus 396 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse (M_r) von 40000 (Duplay *et al.*, 1984), welches von dem Gen *malE* codiert wird. MBP bindet an Amylose und erlaubt darüber eine affinitätschromatographische Reinigung (Maina *et al.*, 1988). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Fusion mit MBP die Löslichkeit eines Proteins erhöhen kann (Terpe, 2003).

Zur Produktion von ComK_{Bmeg} wurde das *comK_{Bmeg}*-Gen mittels PCR aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 amplifiziert und in den Expressionsvektor pMAL-c5E kloniert. Dieser Vektor erlaubt die N-terminale Fusion des MBP an ComK_{Bmeg} und die Produktion des Fusionsproteins in *E. coli*. Zwischen dem MBP und dem fusionierten Protein liegt eine Enterokinase-Schnittstelle, die eine proteolytische Abspaltung des MBP ermöglicht. Die Expression des *malE-comK_{Bmeg}* Fusionskonstruktes erfolgt in Abhängigkeit eines *lac*-Promotors und wird durch IPTG induziert. Das erhaltene Plasmid wurde als pSWEc4 bezeichnet.

Die Proteinproduktion von MBP-ComK_{Bmeg} erfolgte in *E. coli* ER2523, der mit dem Plasmid pSWEc4 transformiert wurde. Um Bedingungen für eine möglichst hohe Proteinausbeute zu identifizieren, wurden verschiedene Parameter getestet. Die Produktion von MBP-ComK_{Bmeg} in *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium in Schikanekolben bei den Temperaturen 17°C, 25°C und 37°C. Die Induktion der Genexpression wurde jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von IPTG induziert (OD_{578nm} 0,5; 1; 2). Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne Induktion. Aus den Kulturen wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6 h nach Induktion Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-Gel-

Analysen aller Bedingungen zeigten bei der induzierten Kultur eine prominente Proteinbande bei einer relativen Molekülmasse von ~60000, die bei der nicht-induzierten Kultur nicht vorlag. Diese Bande stimmt mit der erwarteten relativen Molekülmasse des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins von ~60500 überein (M_r MBP = ~42500; M_r ComK_{Bmeg} = ~18000). Die höchste Konzentration an MBP-ComK_{Bmeg} lag bei einer Produktionstemperatur von 37°C, einer Induktion bei OD_{578nm} von 0,5 und einer Probennahme 2 h nach Induktion vor (Abb. 3.4.2).

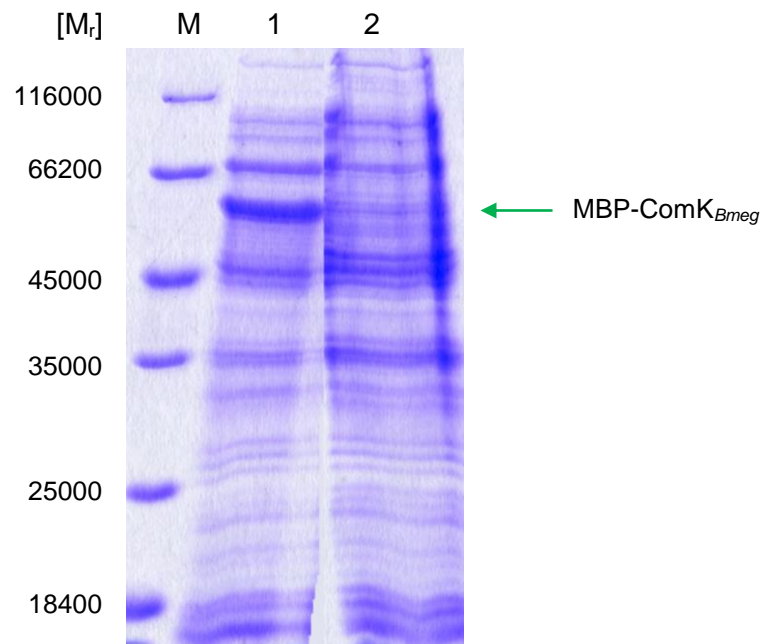


Abbildung 3.4.2: SDS-PAGE-Analyse der intrazellulären rekombinanten MBP-ComK_{Bmeg} Produktion in *E. coli* ER2523, transformiert mit dem pSWec4. Zwei Kulturen wurden parallel bei 37°C kultiviert. Die Induktion der Genexpression des für MBP-ComK_{Bmeg} codierenden *malE-comK_{Bmeg}* bei einer der Kulturen (Spur 1) erfolgte bei einer OD_{578nm} von 0,5 mit 300 µM IPTG. Die andere Kultur wurde nicht induziert (Spur 2). Die Probennahme erfolgte 2 h nach dem Zeitpunkt der Induktion. Es wurden 500 µl Kultur entnommen, die Zellen pelletiert und nach Aufnahme in 100 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 20 µl der Probe wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G250. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

3.4.2.1.1. Affinitätschromatographische Reinigung des produzierten MBP-ComK_{Bmeg}

Das in *E. coli* produzierte MBP-ComK_{Bmeg} sollte im Folgenden affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dazu wurde die Kultivierung wie beschrieben durchgeführt, die Zellen 2 h nach Induktion der Genexpression geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach weiterer Prozessierung wurde der zellfreie Extrakt auf eine Tropfsäule gegeben, die mit einem Amylose-Resin beladen war. Das MBP bindet an die Amylose und erlaubt so die

Reinigung des Fusionsproteins. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution von MBP-ComK_{Bmeg} durch die Zugabe von 10 mM Maltose. Die verschiedenen Fraktionen der Reinigung wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4.3).

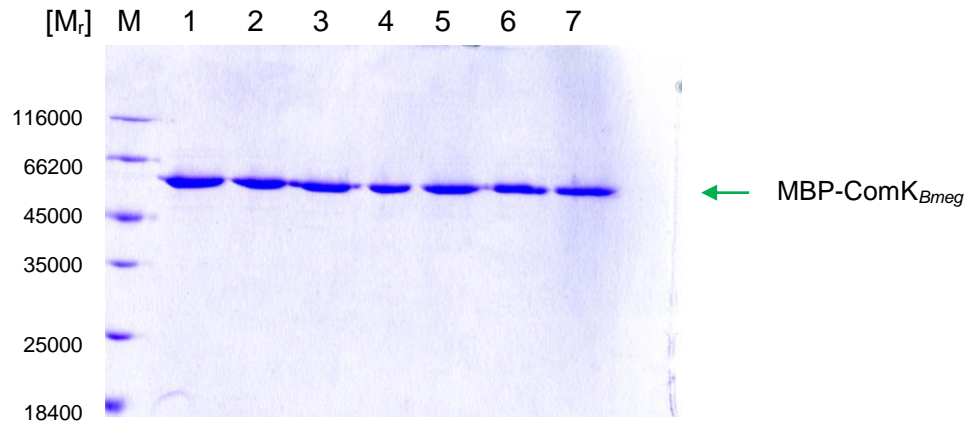


Abbildung 3.4.3: SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen nach affinitätschromatographischer Reinigung von rekombinant produziertem MBP-ComK_{Bmeg} mittels Amylose-Resin. Das MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde in *E. coli* ER25232, transformiert mit pSWEc4, produziert und anschließend mittels Affinitätschromatographie mit Amylose als Säulenmaterial gereinigt. Es wurden Elutionsfraktionen á 1 ml aufgefangen. Je 15 µl der Probe wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben der Elutionsfraktionen (Spur 1 – 7) wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-Gel-Analyse der Elutionsfraktionen zeigte in allen Fraktionen eine prominente Proteinbande bei einer M_r von ~60000 (Abb. 3.4.3). Es waren keine weiteren Banden zu erkennen. Diese Bande entspricht der erwarteten Bande von MBP-ComK_{Bmeg} bei einer M_r von ~60500 (M_r MBP = ~42500; M_r ComK_{Bmeg} = ~18000). Das MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein konnte somit in hoher Konzentration und mit hoher Reinheit mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden.

3.4.2.1.2. Proteolytische Abspaltung des MBP von ComK_{Bmeg}

Da es sich bei dem MBP mit 396 Aminosäuren um ein vielfach größeres Protein handelt als ComK_{Bmeg} mit 159 Aminosäuren, ist davon auszugehen, dass MBP die Eigenschaften von ComK_{Bmeg} stark beeinflusst. Für weitere Analysen war daher die Entfernung des MBP essentiell. Die proteolytische Abspaltung des MBP sollte mit einer Enterokinase erfolgen. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung vereinigt und mit 10 pg Enterokinase pro µg MBP-ComK_{Bmeg} über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4.4).

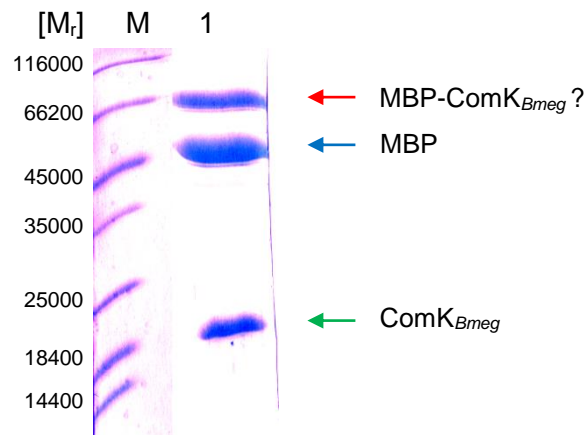


Abbildung 3.4.4: SDS-PAGE-Analyse des Verdaus von MBP-ComK_{Bmeg} mittels Enterokinase. Zur proteolytischen Abspaltung des MBP von ComK_{Bmeg} wurden ~150 µg gereinigtes Fusionsprotein mit 1,5 ng Enterokinase bei 4 ° C inkubiert. Von dem Verdau wurden 15 µl mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Probe (Spur 1) wurde mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande von ComK_{Bmeg}, der blaue Pfeil des abgespaltenen MBP und der rote Pfeil die Bande des potentiell unverdauten MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-Gel-Analyse des Enterokinase-verdauten MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins zeigte drei distinkte Banden mit einer relativen Molekülmasse von ~20000, ~45000 und ~60000 (Abb.3.4.4). Die Bande bei einer M_r von ~20000 stimmte in etwa mit der Erwartung für ComK_{Bmeg} (M_r = ~18000) und die bei einer M_r von ~45000 mit MBP (M_r = ~42500) überein. Die Bande bei einer M_r von ~60000 stimmte mit der erwarteten Größe des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins (M_r = ~62500) überein, was zunächst auf einen unvollständigen Verdau hindeutete. Somit war es möglich, MBP erfolgreich von ComK_{Bmeg} mittels Enterokinase abzuspalten.

Im weiteren Verlauf wurde nun ein vollständiger Verdau angestrebt. Dazu wurden sowohl die Inkubationszeit (bis mehrere Wochen) als auch die Menge an Enterokinase (bis zum 100-fachen) erhöht. Bei allen Versuchen war jeweils noch die Bande bei einer M_r von ~60000 zu sehen (Gele nicht gezeigt). Daher schien es sich entweder um Fusionsprotein zu handeln, bei dem die Enterokinase-Schnittstelle nicht zugänglich ist oder um ein anderes Protein mit der gleichen Größe wie dem Fusionsprotein. Da ComK_{Bmeg} bereits in ausreichender Menge ohne MBP vorlag (Abb. 3.3.4), sollte im Weiteren das MBP inklusive des verbleibenden MBP-ComK_{Bmeg} über eine Affinitätschromatographie vom ComK_{Bmeg} entfernt werden.

3.4.2.1.3. Affinitätschromatographische Entfernung des MBP von ComK_{Bmeg}

Nach der erfolgreichen proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins MBP-ComK_{Bmeg} sollte MBP und das potentiell unverdaute Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie vom abgespaltenen ComK_{Bmeg} gereinigt werden. Das MBP und MBP-ComK_{Bmeg} sollte hierbei an der Säule binden, während ComK_{Bmeg} durch die Säule läuft. Der Verdau wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, mittels Konzentrierungssäule auf ein 25-fach kleineres Volumen eingengt und mit 1 M NaCl auf eine höhere Salzkonzentration umgepuffert. Durch die erhöhte Salzkonzentration sollte die in der ersten Affinitätschromatographie zur Elution eingesetzte Maltose von dem MBP gelöst werden, damit das MBP wieder an das Amylose-Resin binden kann (Maina *et al.*, 1988).

Die Probe wurde auf die Säule gegeben, in mehreren Schritten gewaschen und mit 10 mM Maltose eluiert. Die verschiedenen Fraktionen der Reinigung wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4.5).

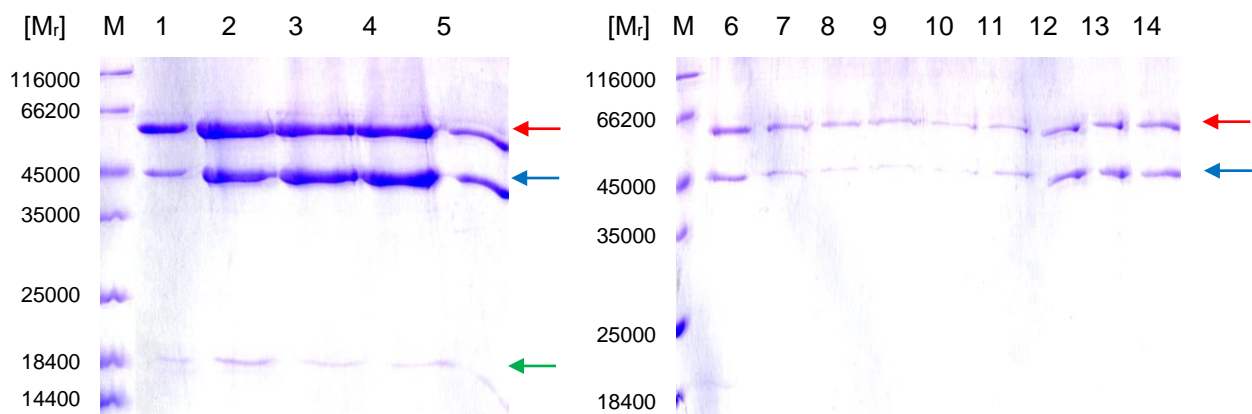


Abbildung 3.4.5: SDS-PAGE-Analyse von gereinigtem MBP-ComK_{Bmeg} nach Enterokinase-Verdau und anschließender Affinitätschromatographie mit Amylose-Resin. Das affinitätschromatographisch gereinigte MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde über Nacht mit der Enterokinase verdaut und anschließend mit einer Konzentrierungssäule auf ein Volumen von 40 µl eingengt. Der Verdau wurden in 1 ml Column-Buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT) mit 1 M NaCl aufgenommen und anschließend erneut über die Amylose-Resin-Tropfsäule gereinigt. Die Elution erfolgte nach mehreren Wachschritten mit 10 mM Maltose. Es wurden Elutionsfraktionen á 1 ml aufgefangen. Je 15 µl der Fraktionen wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben der Durchlaufraktionen (Spur 1 - 7), Waschfraktionen (Spur 4 - 9) und Elutionsfraktionen (Spur 10 - 14) wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande von ComK_{Bmeg}, der blaue Pfeil des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins und der rote Pfeil die Bande des unverdauten MBP-ComK_{Bmeg} oder des unbekannten Proteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-Gel-Analysen zeigten in der Durchlaufraktion der Säule und den ersten fünf Waschfraktionen je drei Proteinbanden mit einer relativen Molekülmasse von ~18500, ~45000 und ~60000 (Abb. 3.4.5). Erneut stimmte die Bande bei einer M_r von ~18500 in etwa mit der Erwartung für ComK_{Bmeg} (M_r = ~18000) und die bei einer M_r von ~45000 mit MBP (M_r = ~42500) überein, wobei erstere im Vergleich zur MBP-Bande sehr schwach konzentriert war. Die Bande bei einer M_r von ~60000 stimmt mit der zuvor beobachteten Bande überein, die entweder auf unverdautes MBP-ComK_{Bmeg} oder auf ein nicht identifiziertes Protein hinweist. In den letzten drei Waschfraktionen und den Elutionsfraktionen sind jeweils die zwei Banden mit einer relativen Molekülmasse von ~45000 und ~60000 zu sehen, die bereits in den vorherigen Fraktionen enthalten waren. Das MBP schien nicht vollständig an dem Amylose-Resin zu binden, sondern lag bereits in der Durchlaufraktion und in den Waschfraktionen vor. Möglicherweise konnte die zuvor zur Elution eingesetzte Maltose nicht vollständig durch die erhöhte Salzkonzentration von dem MBP gelöst werden. Es konnte in keiner der Fraktionen eine einzelne Bande für ComK_{Bmeg} ohne weitere Banden detektiert werden. Somit konnte ComK_{Bmeg} nicht mittels Affinitätschromatographie von dem abgespaltenen MBP und dem Protein mit einer M_r von ~60000 getrennt werden.

3.4.2.1.4. Anionenaustauschchromatographie zur weiteren Reinigung von ComK_{Bmeg}

Nachdem die Trennung von MBP und ComK_{Bmeg} mittels Affinitätschromatographie nicht erfolgreich war, sollten die beiden Proteine sowie das bislang unbekannte Protein mit einer M_r von ~60000 durch eine Anionenaustauschchromatographie getrennt werden. Hierbei erfolgt die Auftrennung von Proteinen auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladungen. Die Proteine interagieren unterschiedlich stark mit einer positiv geladenen stationären Phase, wodurch sich unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten und somit eine Auftrennung der verschiedenen Proteine ergeben. Die Bindeeigenschaft der einzelnen Proteine ist hierbei abhängig von dem jeweiligen isoelektrischen Punkt der Proteine und kann durch den pH-Wert des Laufmittels beeinflusst werden.

Die Auftrennung erfolgte bei einem pH-Wert von 8,0 und mit Q-Sepharose als Säulenmaterial in einer Tropfsäule. Das Fusionsprotein MBP-ComK_{Bmeg} wurde nach dem Verdau mit der Enterokinase von einem pH von 7,4 auf 8,0 umgepuffert, auf die Säule gegeben und nach mehreren Waschschritten mit NaCl in zunehmender Konzentration von 10 mM bis 500 mM eluiert. Die verschiedenen Fraktionen der Reinigung wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4.6).

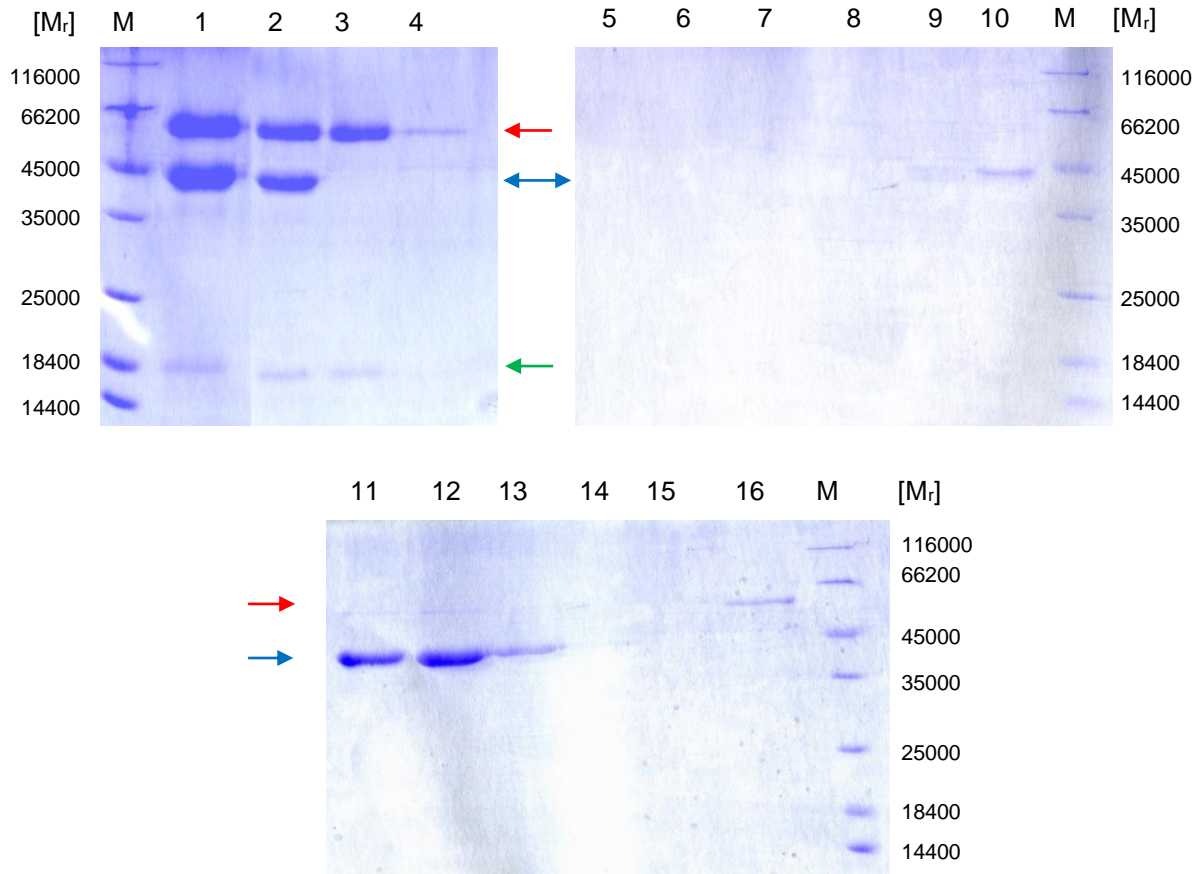


Abbildung 3.4.6: SDS-PAGE-Analyse von MBP-ComK_{Bmeg} nach Enterokinase-Verdau, Umpufferung und Reinigung durch die Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose. Das affinitätschromatographisch gereinigte MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde über Nacht mit der Enterokinase verdaut. Anschließend wurden 2,5 ml des Verdaus über eine Nap-25-Säule von einem pH von 7,5 auf 8,0 umpufferf und mit 3,5 ml Säulenpuffer (10 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)) eluiert. Die Probe wurde auf eine Q-Sepharose Tropfsäule gegeben. Nach mehreren Waschschrirten erfolgte die Elution mit steigenden NaCl Konzentrationen (je 1 ml mit 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 oder 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)). Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen, je 15 µl der Fraktionen mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben des Verdaus (Spur 1), nach der Umpufferung (Spur 2), der Durchlaufraction (Spur 3), der vereinigten Waschraktionen (Spur 4) und der Elutionsfraktionen (Spur 5 – 16; Elution mit je: 10 mM, Spur 5; 25 mM, Spur 6; 50 mM, Spur 7; 75 mM, Spur 8; 100 mM, Spur 9; 125 mM, Spur 10; 150 mM, Spur 11; 175 mM, Spur 12; 200 mM, Spur 13; 225 mM, Spur 14; 250 mM, Spur 15 und 500 mM NaCl, Spur 16) wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande von ComK_{Bmeg}, der blaue Pfeil des MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins und der rote Pfeil die Bande des unverdauten MBP-ComK_{Bmeg} oder des unbekannten Proteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-Gel-Analyse des Verdaus von MBP-ComK_{Bmeg} mit der Enterokinase zeigte sowohl vor als auch nach der Umpufferung ein ähnliches Proteinmuster. Es waren jeweils drei distinkte Proteinbanden mit einer relativen Molekülmasse von ~18500, ~45000 und ~60000 zu erkennen, wobei die ComK_{Bmeg} repräsentierende Bande nur sehr schwach konzentriert war. Wie zuvor stimmten die Banden mit den Erwartungen überein. Erneut war ein Verdau erkennbar, sowie die Umpufferung auf einen pH von 8,0 erfolgreich. In der Durchlaufraktion der Probe durch die Q-Sepharose Tropfsäule waren Banden bei einer relativen Molekülmasse von ~18500 (ComK_{Bmeg}) und ~60000 (unbekanntes Protein) zu erkennen, während die Bande bei einer M_r von ~45000 (abgespaltenes MBP), in dieser Fraktion fehlte. Somit passierte ComK_{Bmeg} die Säule während MBP an der Säule gebunden blieb, was erstmal eine Trennung von abgespaltenem ComK_{Bmeg} und MBP anzeigte. Es war jedoch nicht möglich, das Protein mit einer M_r von ~60000 in diesem Schritt von ComK_{Bmeg} zu trennen. In den vereinigten Waschfraktionen war eine schwache Bande für das Protein bei einer M_r von ~60000 sichtbar, während in den Elutionsfraktionen bei NaCl Konzentrationen von 125 mM bis 200 mM eine einzelne Bande bei einer M_r von ~45000 (MBP), dem abgespaltenen MBP entsprechend, vorhanden war. MBP konnte also bei einer NaCl Konzentration von 125 mM bis 200 mM eluiert werden.

Obgleich mit der Anionenaustauschchromatographie das abgespaltene MBP von dem ComK_{Bmeg} getrennt werden konnte, war weiterhin das Protein mit einer M_r von ~60000 in der Probe mit ComK_{Bmeg} vorhanden. Dabei lag dieses Protein in einer höheren Konzentration als ComK_{Bmeg} vor, so dass weitere proteinbiochemische Analysen von ComK_{Bmeg} so noch nicht möglich waren. Für die weiteren Reinigungsschritte wurde die Durchlaufraktion der Anionenaustauschchromatographie eingesetzt, in der nur ComK_{Bmeg} und das Protein mit einer M_r von ~60000 enthalten war (Abb. 3.4.6, Spur 3). Die Trennung dieser beiden Proteine sollte durch eine weitere Anionenaustauschchromatographie bei verändertem pH-Wert erreicht werden. So musste zunächst eine Bedingung identifiziert werden, bei der entweder ComK_{Bmeg} an die Q-Sepharose bindet während das andere Protein im Durchlauf oder einer Waschfraktion war, oder umgekehrt. Die Durchlaufraktion wurde von einem pH 8,0 in verschiedenen Ansätzen auf einen pH-Wert von 8,5, 9,2 oder 10 umgepuffert und anschließend wie zuvor der Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Bei keiner der verwendeten Bedingungen konnte eine Trennung der Proteine erreicht werden. Die SDS-PAGE Analysen zeigten ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Anionenaustauschchromatographie bei einem pH-Wert von 8,0 (Abb. 3.4.6.; SDS-Gele der anderen pH-Werte nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde versucht, eine Trennung mittels Kationenaustauschchromatographie bei einem pH-Wert von 5,0 und SP-Sepharose als Säulenmaterial zu erreichen. Die Kationenaustauschchromatographie trennt ebenfalls Proteine anhand ihrer spezifischen

Ladung, wobei das Säulenmaterial hierbei negativ geladen ist. Auch bei dieser Methode konnte keine Trennung von ComK_{Bmeg} und dem Protein mit einer M_r von ~60000 erreicht werden (SDS-Gele nicht gezeigt).

Insgesamt konnte also das Fusionsprotein MBP-ComK_{Bmeg} erfolgreich produziert, affinitätschromatographisch gereinigt und der MBP-Tag entfernt werden. Jedoch gelang es nicht, dass nicht identifizierte Proteine mit einer relativen Molekülmasse von ~60000 zu entfernen und reines ComK_{Bmeg} zu erhalten. Daher konnte das hier produzierte ComK_{Bmeg} nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

Bei folgenden Arbeiten wurde festgestellt, dass es bei der Produktion von ComK_{Bmeg} zu einer Bindung des Chaperons GroEL an ComK_{Bmeg} und in der Folge zu einer Co-Reinigung kam. Das Protein GroEL hat eine M_r von ~58000 und damit eine ähnliche Größe wie das nicht identifizierte Proteine mit einer M_r von ~60000. Angesichts dessen ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem hier beobachteten Protein um GroEL handelte, und nicht um unverdautes MBP-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein. Mit einer M_r von ~60500 hat MBP-ComK_{Bmeg} eine ähnliche Größe wie GroEL, weshalb die beiden Proteine in einer SDS-PAGE-Analyse nicht als zwei unabhängige Banden identifiziert werden konnten (siehe Abb. 3.4.3).

3.4.2.2. Produktion von ComK_{Bmeg} mit GST

Da die Produktion von reinem rekombinantem ComK_{Bmeg} über eine Fusion mit MBP nicht gelungen war, sollte ComK_{Bmeg} mit einem alternativen Tag produziert und gereinigt werden. Dazu wurde das Protein GST (Glutathion-S-Transferase) als Fusions-Tag gewählt. Wie für das MBP ist für diesen Tag beschrieben, dass dessen Fusion die Löslichkeit des Fusionspartners erhöhen kann (Terpe, 2003). Bei der hier verwendeten GST handelt es sich um ein 244 Aminosäuren großes Protein mit einer relativen Molekülmasse von ~26000. Es bindet an Glutathion-Sepharose und ermöglicht so eine affinitätschromatographische Reinigung des produzierten Fusionsproteins (Smith und Johnson, 1988). Das Protein ComK_{Bmeg} sollte mit einem N-terminalen GST-Tag fusioniert in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen intrazellulär produziert werden. Dazu wurde das *comK_{Bmeg}*-Gen mittels PCR aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert (pSWEc3). Dieser Vektor enthält die codierende Sequenz für den GST-Tag und erlaubt eine N-terminale Fusion an ComK_{Bmeg}. Zwischen dem GST-Tag und dem hier fusionierten ComK_{Bmeg} liegt die spezifische Schnittstelle für die PreScission Protease, wodurch eine proteolytische Abspaltung des GST-Tags von dem ComK_{Bmeg} Protein möglich war. Die Expression des *gst-comK_{Bmeg}* Konstruktes liegt unter Kontrolle des *lac*-Promotors und konnte durch Zugabe von IPTG induziert werden. Zur rekombinanten Produktion von GST-ComK_{Bmeg} wurde *E. coli* BL21 (DE3), transformiert mit dem Plasmid pSWEc3, kultiviert und unter verschiedenen Bedingungen überprüft, ob es nach Induktion der Genexpression

mit IPTG zur Produktion des gewünschten Fusionsproteins kommt, um so die am besten geeigneten Bedingungen hinsichtlich der Proteinmenge zu identifizieren. Dazu wurden die Kulturen in separaten Versuchen je aerob bei 17°C oder 37°C kultiviert und die Genexpression zu verschiedenen Wachstumsphasen (OD_{578nm} 0,5, 1, 2) induziert, wobei jeweils eine Kultur ohne Induktion als Negativkontrolle mitgeführt wurde. Die Probennahme zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte direkt vor sowie 2, 4 und 6 h nach Induktion sowie nach Kultivierung über Nacht. Für jede Probe wurde die intrazelluläre Gesamt-Proteinfraktion mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei wurde die gewünschte GST-ComK_{Bmeg} Proteinbande mit einer berechneten relativen Molekülmasse von $M_r = \sim 45000$ anhand eines Größenstandards identifiziert und die bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen erhaltenen Proteinmengen visuell miteinander verglichen. Die höchste Konzentration an rekombinantem GST-ComK_{Bmeg} konnte bei der Kultivierung bei 17°C und einer Induktion bei OD_{578nm} von 0,5 zu dem Zeitpunkt 6 h nach der Induktion beobachtet werden (Abb. 3.4.7).

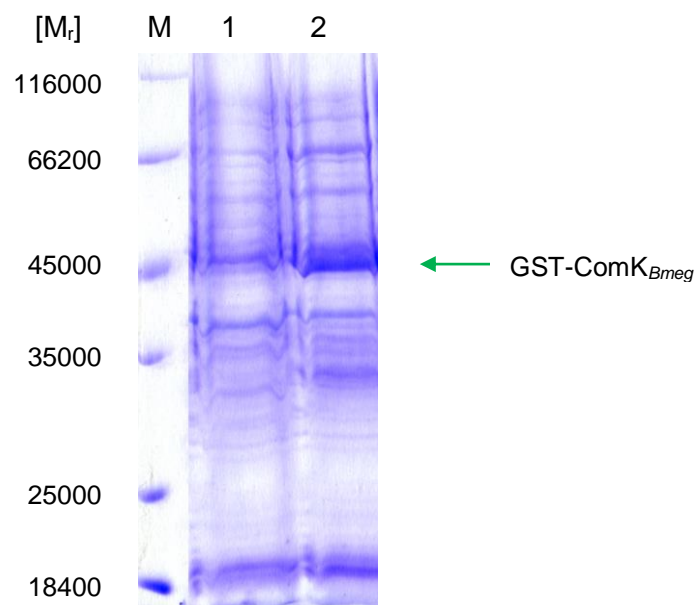


Abbildung 3.4.7: SDS-PAGE-Analyse der intrazellulären rekombinanten GST-ComK_{Bmeg} Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert mit pSWec3. Zwei Kulturen wurden parallel bei 17°C kultiviert. Die Induktion der Genexpression von *gst-comK_{Bmeg}* bei einer der Kulturen (Spur 2) erfolgte bei einer OD_{578nm} von 0,5 mit 1 mM IPTG. Die andere Kultur wurde nicht induziert (Spur 1). Die Probennahme erfolgte 6 h nach dem Zeitpunkt der Induktion. Es wurden 500 µl Kultur entnommen, die Zellen pelletiert und nach Aufnahme in 100 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 20 µl der Probe wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G250. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande des GST-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte das rekombinant produzierte ComK_{Bmeg} mit dem N-terminal fusionierten Glutathion-S-Transferase-Tag auf der Laufhöhe einer relativen Molekülmasse von $M_r = \sim 45000$ (GST-Tag: $M_r = \sim 27000$, ComK_{Bmeg} $M_r = \sim 18000$), die bei der nicht-induzierten Negativkontrolle fehlte (Abb. 3.4.7). Somit konnte gezeigt werden, dass sich das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein unter diesen Bedingungen erfolgreich in *E. coli* produzieren lässt.

3.4.2.2.1. Affinitätschromatographische Reinigung des produzierten GST-ComK_{Bmeg}

Das rekombinant produzierte GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein sollte affinitätschromatographisch mittels einer Glutathion-Sepharose Tropfsäule gereinigt werden. Dazu wurde *E. coli* BL21 (DE3), transformiert mit dem Plasmid pSWec3, unter den zuvor identifizierten Bedingungen kultiviert und 6 h nach der Induktion die Zellen geerntet. Das Zellsediment wurde gewaschen und die Zellen mit einem Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde nach einer Zentrifugation auf eine Glutathion-Sepharose Tropfsäule gegeben. Die Elution des GST-ComK_{Bmeg} erfolgte nach mehreren Waschschritten durch Zugabe von 10 mM reduziertem Glutathion, welches an die GST des Fusionsproteins bindet und somit die Bindung an das Säulenmaterial löst. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.4.8).

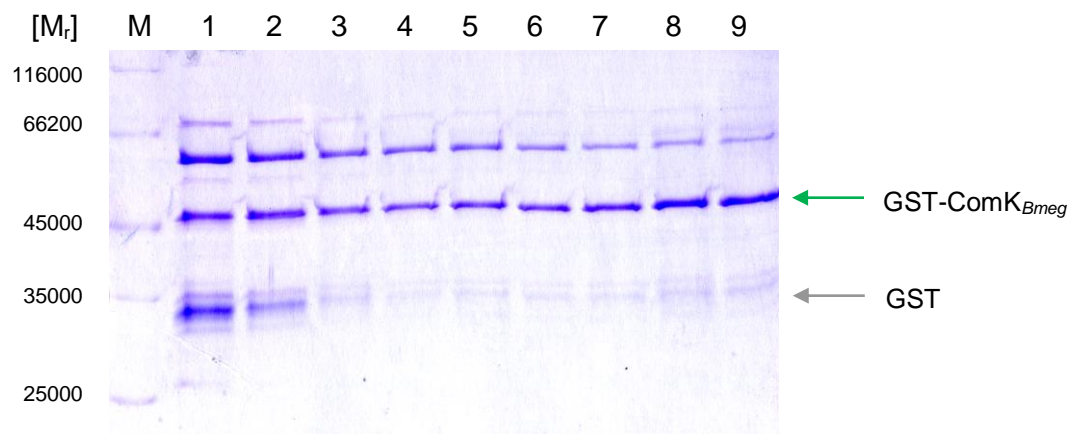


Abbildung 3.4.8: SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen nach affinitätschromatographischer Reinigung von rekombinant produziertem GST-ComK_{Bmeg} mittels Glutathion-Sepharose. Das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21 (DE3), transformiert mit pSWec3, produziert und anschließend mittels Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose als Säulenmaterial gereinigt. Es wurden Elutionsfraktionen á 1 ml aufgefangen. Je 15 µl der Fraktionen wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben der Elutionsfraktionen (Spur 1 – 9) wurden mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt. Der grüne Pfeil kennzeichnet die Proteinbande des GST-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins, der graue Pfeil die abgespaltene GST (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte definierte Proteinbanden unterschiedlicher Größe (Abb. 3.4.8). In allen Fraktionen war eine Bande mit einer relativen Molekülmasse von ~45000 sichtbar, was der Größe des GST-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins entspricht, wobei die Intensität dieser Banden in alle Elutionsfraktionen ähnlich war. Weiter war in den ersten beiden Elutionsfraktionen eine deutliche Bande bei einer relativen Molekülmasse von ~35000 zu sehen, die in deutlich abgeschwächter Intensität auch in den folgenden Fraktionen vorhanden war. Dabei handelte es sich vermutlich um das reine GST Protein ohne ComK_{Bmeg}. Bei der Produktion von Fusionsproteinen mit N-terminalem GST-Tag kann es zu der Produktion des GST Proteins kommen, bei der das C-terminal fusionierte Protein nicht translatiert wird (persönliche Absprache, AG Moser, TU Braunschweig). Neben diesen erwarteten Proteinbanden zeigte sich in allen aufgetragenen Fraktionen eine Bande mit einer relativen Molekülmasse von ~60000. Um die Identität der jeweiligen Banden genauer bestimmen zu können, wurde im Anschluss ein Western-Blot mit einem Anti-GST Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den GST-Tag und kann über die gekoppelte alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Dazu wurde die erste Elutionsfraktion der Affinitätschromatographischen Reinigung (Abb. 3.4.8) per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot analysiert (Abb. 3.4.9).

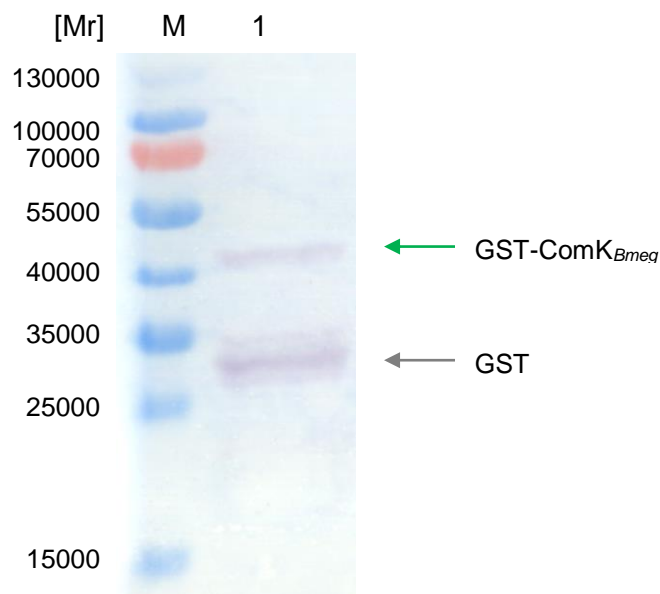


Abbildung 3.4.9 : Immunhistochemische Detektion des GST-Tags mittels Western-Blot in der ersten Elutionsfraktion der Affinitätschromatographischen Reinigung des rekombinant produzierten GST-ComK_{Bmeg}. Die per SDS-PAGE aufgetrennte Elutionsfraktion 1 (siehe Abb. 3.4.8) (Spur 1) wurde mit einem Größen- und Mengenstandard (Spur M; PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)) auf eine PVDF-Transfermembran gebロットet. Der GST-Tag wurde durch einen alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-GST-Antikörper detektiert (grüner Pfeil: GST-ComK_{Bmeg}; grauer Pfeil: GST). Der gebundene Antikörper wurde durch eine bei der Induktion mit NBT und BCIP stattfindende enzymatische Reaktion sichtbar gemacht (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Beim Western-Blot wurden zwei spezifische Banden durch den Anti-GST Antikörper detektiert (Abb. 3.4.9). Dabei entsprach eine Bande mit einer relativen Molekülmasse von ~45000 der Größe des GST-ComK_{Bmeg} Fusionsproteins, die andere mit einer relativen Molekülmasse von ~27000 dem GST-Tag ohne ComK_{Bmeg}, womit die Identität dieser Banden bestätigt werden konnte. Die auf dem SDS-Gel sichtbare Bande mit einer relativen Molekülmasse von ~60000 wurde nicht vom Anti-GST Antikörper erkannt. Um die Identität dieser unbekannten Proteinbande zu klären, wurde es einer N-terminalen Sequenzierung unterzogen (Beate Jaschock-Kentner, HZI Braunschweig). Hierdurch konnte das Protein eindeutig als GroEL identifiziert werden. Bei GroEL handelt es sich um ein bekanntes Chaperon in *E. coli* mit einer M_r von ~58000 (Slonczewski und Foster, 2012). Es unterstützt die intrazelluläre Faltung von Proteinen und trägt unter denaturierenden Bedingungen zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Proteinen bei. Bei der Überproduktion von Proteinen, wie hier dem GST-ComK_{Bmeg}, kann es auf Grund der großen Mengen von produziertem Protein zur fehlerhaften Faltung und strukturellen Instabilität der Proteine kommen. Als Reaktion auf diese Form des Stresses werden von der Zelle verstärkt Chaperone wie GroEL produziert, die dann mit hoher Affinität an die instabilen Proteine binden, um ein für die Zelle potentiell schädliches Denaturieren zu verhindern. Offenbar kam es hier also bei der rekombinanten Produktion von GST-ComK_{Bmeg} zu einer unerwünschten Co-Reinigung des Chaperons GroEL. Da davon auszugehen ist, dass GroEL verhältnismäßig fest an das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein gebunden war und es somit auch seine Eigenschaften beeinflussen könnte, stellte dieses Phänomen ein großes Problem hinsichtlich der weiteren Analysen dar. So war zu erwarten, dass beispielsweise die DNA-bindenden Eigenschaften oder die mögliche Multimerisierung beeinträchtigt sind. Somit war es erforderlich, eine Reduzierung des GroEL-Gehalts in den ComK_{Bmeg} Proteinproben zu erreichen.

3.4.2.2.2. Abspaltung des GST-Tags sowie Entfernung des Chaperons GroEL von ComK_{Bmeg}

Das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein konnte erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3) produziert und affinitätschromatographisch weitgehend gereinigt werden, wobei auch das Chaperon GroEL in allen Fraktionen detektiert wurde. Um für weitere Untersuchungen reines ComK_{Bmeg} zu erhalten, sollte im Folgenden zum einen der GST-Tag abgespalten sowie das Chaperon GroEL entfernt werden. Für die Abspaltung des GST-Tags wurde die PreScission Protease genutzt, die zwischen ComK_{Bmeg} und GST an einer spezifischen Stelle schneidet. Dieser Vorgang wurde mit an Glutathion-Sepharose gebundenem GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein durchgeführt, so dass nach Spaltung ComK_{Bmeg} von der Säule gewaschen und so für weitere Analysen in ungetaggt Form genutzt werden konnte. Der GST-Protein-Tag, wie auch die

hier genutzte GST-getaggte PreScission Protease, bleiben an das Säulenmaterial gebunden und werden nicht mit dem ComK_{Bmeg} herausgewaschen.

Das GroEL wiederum sollte durch die Zugabe von denaturierten *E. coli*-Proteinen und ATP entfernt werden. Diese Methode beruht darauf, dass das GroEL auf Grund der hydrophoben Bereiche der denaturierten Proteine mit höherer Affinität an diese bindet und sich somit vom ComK_{Bmeg} ablösen sollte (Rial und Ceccarelli, 2002).

Nach Bindung des GST-ComK_{Bmeg}-GroEL-Komplexes an die Sepharose und einem Waschschrift folgte ein weiterer Waschschrift mit Hitze-denaturierten *E. coli* BL21 (DE3)-Proteinen sowie ATP. Das Säulenmaterial wurde mehrmals in diesem Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut ohne *E. coli* Proteine gewaschen, die PreScission Protease dazu gegeben, resuspendiert, erneut bei 4°C über Nacht inkubiert und gewaschen. Das vom GST-Tag abgespaltene und von GroEL abgelöst ComK_{Bmeg} Protein sollte in diesen letzten Waschfraktionen enthalten sein. Anschließend erfolgte eine Elution der an die Säule gebundenen GST-Proteine (abgespaltene sowie als Einzelform produzierte GST und die GST-getaggte PreScission Protease) mit Glutathion. Die letzten Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Page analysiert (Abb. 3.4.10).

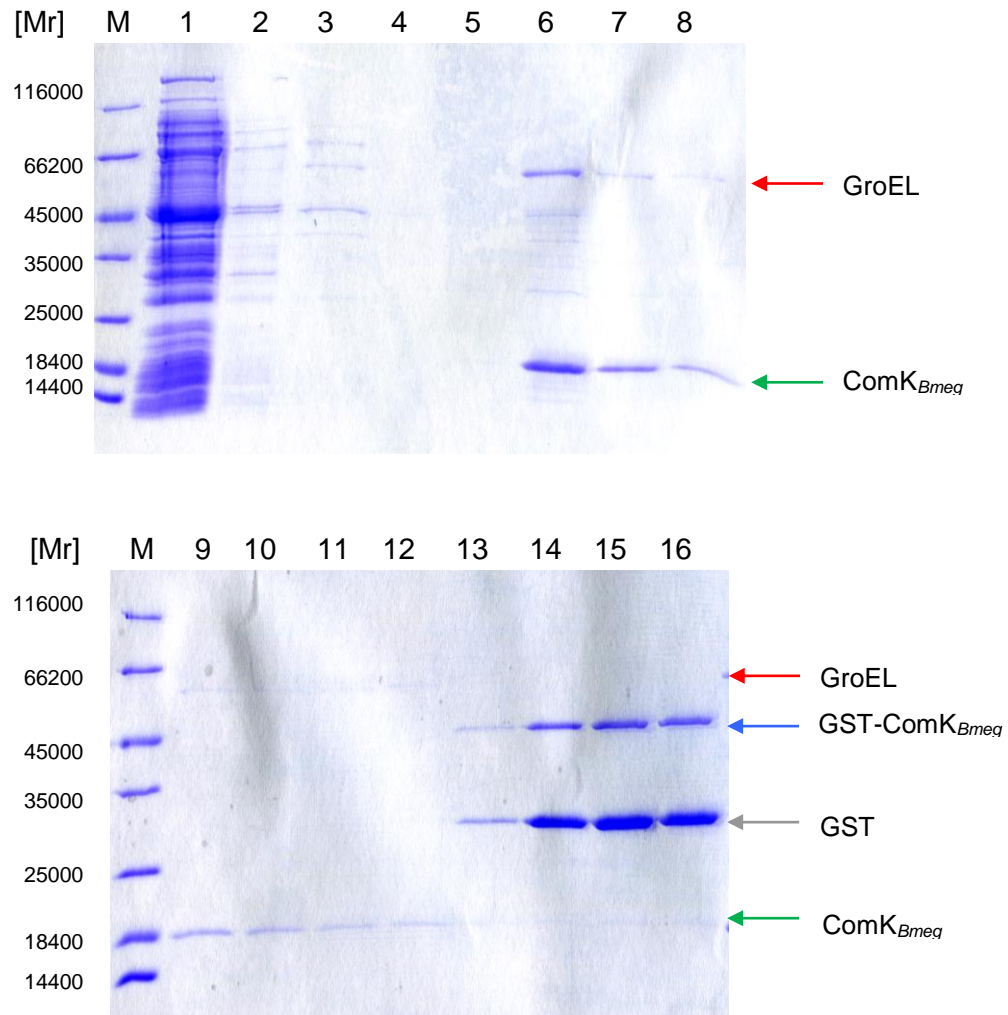


Abbildung 3.4.10: SDS-PAGE-Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von rekombinant produziertem GST-ComK_{Bmeg} nach Abspaltung des GST-Tags und Entfernung des Chaperons GroEL. Das GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21 (DE3), transformiert mit pSWec3, produziert. Die affinitätschromatographische Reinigung erfolgte mit Glutathion-Sepharose als Säulenmaterial (Spur 1: Durchlauf Zellextrakt; Spur 2: Waschfraktion mit Waschpuffer). Zur Abtrennung des Chaperons GroEL (roter Pfeil) wurde mit Waschpuffer, ergänzt durch 1,0 mg/ml denaturiertem *E. coli*-Gesamtprotein, 50 mM ATP und 20 mM MgCl₂, ü.N. bei 4 ° C gewaschen (Spur 3 - 5). ComK_{Bmeg} wurde mittels proteolytischem Verdau auf der Säule mit der PreScission Protease vom GST-Tag abgespalten und von der Säule gewaschen (Spur 6 - 12, grüner Pfeil). Der am Säulenmaterial gebundene, abgespaltene GST-Tag (grauer Pfeil), ungeschnittenes GST-ComK_{Bmeg} Fusionsprotein (blauer Pfeil) sowie die mit GST-Tag versehene PreScission Protease wurden mit 10 mM reduziertem Glutathion eluiert (Spur 13 - 16). Die jeweiligen Fraktionen wurden zu 1 ml aufgefangen, 15 µL entnommen, mit 5 µL SDS Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und zusammen mit einem Mengen- und Größenstandard (Spur M: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Bei der SDS-PAGE Analyse konnte für die Waschfraktionen nach der Inkubation mit denaturierten *E. coli*-Proteinen weniger GroEL als ComK_{Bmeg} festgestellt werden (Spur 6 - 13). Somit sollte in diesen Fraktionen ein Teil ComK_{Bmeg} in freier Form ohne GroEL vorliegen. In den folgenden Elutionsfraktionen (Spur 13 - 16) ließen sich zwei starke Proteinbanden bei einer relativen Molekülmasse von ~45000 und ~27000 erkennen, wobei die obere Bande dem Fusionsprotein GST-ComK_{Bmeg} und die untere Bande dem GST-Tag ohne Fusionsprotein entsprach. Die Elution von intaktem Fusionsprotein zeigte einen unvollständigen Verdau mit der PreScission Protease an. Möglicherweise waren einige Fusionsproteine auf Grund ihrer Konformation nicht für die Protease zugänglich oder die eingesetzte Menge der Protease war für einen vollständigen Verdau zu gering. Das freie, gereinigte ComK_{Bmeg} wurde im Folgenden für DNA-Bindestudien eingesetzt.

3.4.3. DNA-Bindestudien mit ComK_{Bmeg}

Da das Protein ComK aus *B. subtilis* (ComK_{Bsub}) als DNA-bindender Transkriptionsfaktor bekannt ist, sollte untersucht werden, ob für ComK_{Bmeg} ebenfalls spezifische DNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen werden können. Dazu wurden das zuvor in *E. coli* produzierte und gereinigte ComK_{Bmeg} für „EMSA“-Experimente („Electrophoretic Mobility Shift Assay“) eingesetzt. Dabei wird das Laufverhalten von spezifischen DNA-Fragmenten in Abhängigkeit von hinzugegebenem Protein in einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (Garner und Revzin, 1981). Falls eine Bindung des Proteins an die DNA stattfindet, wandert dieser Komplex auf Grund seiner Größe langsamer in dem Gel als DNA ohne gebundenes Protein. Dieser Unterschied im Laufverhalten kann durch das Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Transkriptionsfaktoren binden spezifisch an DNA-Sequenzen, deren sogenannte Bindesequenzen. Daher sollte für die „EMSA“-Analysen von ComK_{Bmeg} ein DNA-Fragment eingesetzt werden, für das eine spezifische Bindung erwartet werden konnte. Allerdings war bis dato für ComK_{Bmeg} im Gegensatz zu ComK_{Bsub} keine spezifische Bindesequenz postuliert. Bei Transkriptomanalysen von *B. megaterium* DSM-319 konnten jedoch einige Gene identifiziert werden, deren Expression durch eine Überproduktion von ComK_{Bmeg} positiv oder negativ reguliert wurde (persönliche Kommunikation, Dr. Simon Stammen). Hierbei wurde eine ~120-fache Hochregulation der Expression des für eine Zellwandhydrolase codierenden Gens *cw/C* festgestellt, wobei jedoch anhand dieser Daten nicht zwischen einer direkten und indirekten Regulation unterschieden werden kann. Das Protein Cw/C aus *B. megaterium* DSM-319 weist N-terminal (Aminosäure 1 - 182) eine AmiC Domäne auf, der eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase Funktion bei der Zellwandbiogenese zugeschrieben wird (Accession number: COG0860). In *B. subtilis* 168 findet sich ein homologes Protein Cw/C mit einem „E-value“ von 6×10^{-47} im Vergleich zu Cw/C aus *B. megaterium* DSM-319. Für dieses Protein konnte eine Funktion bei der Zellwandhydrolyse im Rahmen der Sporulation gezeigt werden (Smith und Foster, 1995; Mishima *et al.*, 2005). Da in dem Cw/C aus *B. megaterium* DSM-319 jedoch keine sporulationsspezifischen Domänen (SPOR Domäne) identifiziert werden konnten, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es ebenfalls eine Funktion im Zusammenhang mit der Sporulation ausübt.

Bei der Sequenzanalyse des intergenischen DNA-Abschnittes, der upstream des *cw/C* Gens liegt (im Folgenden als „Promotorfragment“ bezeichnet), konnten ComK_{Bsub} spezifische Bindesequenzen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um sogenannte K-Boxen mit der Basensequenz AAAA-N₅-TTTT (Susanna *et al.*, 2007). Auf Grund der Homologie von ComK_{Bsub} und ComK_{Bmeg} ist es denkbar, dass beide Proteine an dieselbe Basensequenz binden, auch wenn sie unterschiedliche zelluläre Aufgaben in der Zelle erfüllen. Zusammengenommen stellen sowohl die beobachtete Regulation der Expression von *cw/C*

durch die Überproduktion von ComK_{Bmeg} aus den Transkriptomanalysen, sowie das Vorliegen der K-Boxen in dem Promotorfragment von *cwI/C* die ersten verfügbaren Hinweise auf eine mögliche Bindung von ComK_{Bmeg} an dieses DNA-Fragment dar. Daher wurde das Promotorfragment von *cwI/C* für die „EMSA“-Untersuchungen eingesetzt.

Das Promotorfragment wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 amplifiziert (379 bp) und gereinigt. Als Negativkontrollen diente ein vom 5'-Ende verkürzter Bereich des Promotorfragments (134 bp), in dem keine postulierten K-Boxen enthalten waren (Abb. 3.4.11). Das Fragment der Negativkontrolle diente zum Nachweis von unspezifischer Bindung von ComK_{Bmeg} an DNA, die nicht auf den postulierten K-Boxen oder anderen spezifischen Sequenzen beruhte.

A

5' - gctcggattttttatgtctatggtaaaagtaaaaataagtttcgtgtatgtatgttgccttctaactggtgattggaagcgaagcgaagactcccgccgaaagcggaagtcttcacggaaatcaacagcggtgtaatgagattcacgctagctcatttatccgtctta

tttgtgctttaaaacagcggggaatacctagcgaaatccttccttcttgtgtgaattttttgaatgttttaagggaacgaacccttctt

gtccaatcgcatatatatatagaatgagagataaaacatcagggcaaaagccgatgttaatcacaaattctttcatattatgattgaa

aggaaggttcacATGaaaaaaca - 3'

B

Promotorfragment von *cwI/C*:

5' -  - 3'

Kontrollfragment:

5' -  - 3'

Abbildung 3.4.11: Verwendete DNA-Fragmente für die DNA-Bindestudien von ComK_{Bmeg} mittels EMSA. (A) Nukleotidsequenz der verwendeten DNA-Fragmente. Das zur Überprüfung der Bindung von ComK_{Bmeg} verwendete Promotorfragment ist rot unterstrichen. Die in diesem Fragment liegenden K-Boxen sind blau hinterlegt. Das Kontrollfragment, das als Negativkontrolle bei den Bindestudien dient, ist in grüner Schrift dargestellt. Das Startcodon (Großbuchstaben) und die ersten drei Codons des *cwI/C* Gens sind grau hinterlegt. **(B)** Schematische Darstellung der beiden DNA-Fragmente (Promotorfragment und Kontrollfragment) in maßstabsgetreuem Größenverhältnis. Die K-Boxen im Promotorfragment sind in blau dargestellt.

Für die „EMSA“-Experimente wurden beide DNA-Fragmente zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen an ComK_{Bmeg} für 30 min in „EMSA“-Puffer inkubiert und anschließend in einem nativen 5%igen Polyacrylamidgel bei 100 V für ca. 1 Stunde aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen (Abb. 3.4.12).

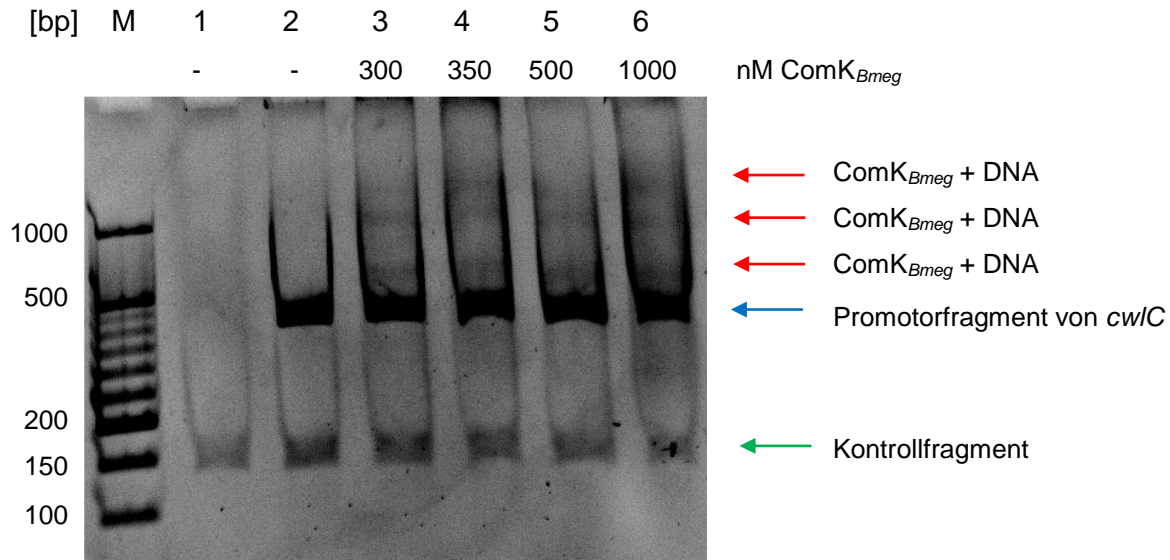


Abbildung 3.4.12: DNA-Bindestudien von ComK_{Bmeg} an dem Promotorfragment von *cw/C* mittels „EMSA“. Die DNA-Fragmente (25 nM) (blauer Pfeil: Promotorfragment von *cw/C*, keine DNA in Spur 1; grüner Pfeil: Kontrollfragment) wurden mit unterschiedlichen Mengen an ComK_{Bmeg} (0 - 1000 nM; siehe Beschriftung) inkubiert und anschließend auf ein 5%iges natives Polyacrylamidgel geladen (Spur 1 - 6; Spur M: Größen- und Mengenstandard, O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas)). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (100 V, 1h) wurden die DNA-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. Rote Pfeile zeigen nach oben geshiftete DNA-Banden an (modifiziert nach Wienecke, 2012).

Nach Anfärben des Polyacrylamidgels waren auf dem Gel distinkte DNA Banden zu sehen. In den Spuren 1 - 6 war je die erwartete Bande des Kontrollfragments bei 134 bp und in Spuren 2 - 6 die erwartete Bande des Promotorfragments von *cw/C* bei 379 bp erkennbar. Die einzelnen Banden zeigten in allen Spuren eine gleichbleibende Intensität. In den Spuren in denen die ComK_{Bmeg} enthaltenden Proben aufgetragen wurden (Spur 3 - 6), konnte über der Bande des *cw/C*-Promotorfragments ein DNA-„Schmier“ sowie drei schwache DNA-Banden (~600 bp, ~1000 bp, > 1000 bp) beobachtet werden. Da dieses Banden in den Spuren ohne ComK_{Bmeg} (Spur 1 - 2) fehlten, sollte es sich um eine Interaktion von ComK_{Bmeg} mit DNA handeln. Allerdings konnte bei den hier durchgeführten Experimenten kein vollständiger Shift des *cw/C*-Promotorfragments beobachtet werden. Bei einem vollständigen Shift wäre das Promotorfragment von *cw/C* mit zunehmender ComK_{Bmeg} Konzentration schwächer geworden und ab einer gewissen Konzentration nicht mehr sichtbar. Das

Ausbleiben des vollständigen Shifts könnte mit einer schwachen Affinität von ComK_{Bmeg} zu DNA begründet werden, so dass ein Teil der DNA zu jedem Zeitpunkt ohne gebundenes Protein vorliegt. Die Bindung von Proteinen an DNA bei „EMSA“-Analysen ist stark abhängig von den Pufferbedingungen, so dass mit anderen Puffern möglicherweise ein vollständiger Shift erreicht werden könnte. Auf das Laufverhalten des Kontrollfragments zeigte die Zugabe von ComK_{Bmeg} keinen Einfluss. Hier ist kein DNA-„Schmier“ oder zusätzliche Banden zu sehen, außerdem bleibt auch die Konzentration dieser Bande konstant. Daher scheint es sich um eine spezifische Interaktion von ComK_{Bmeg} mit dem Promotorfragment von *cw/C* zu handeln. Dieses könnte auf den in dem DNA-Fragment enthaltenen K-Boxen beruhen. An Hand der hier erhaltenen Daten kann allerdings noch keine definitive Aussage über die Bindesequenz von ComK_{Bmeg} getroffen werden. Jedoch scheint ComK_{Bmeg} an spezifische DNA Sequenzen zu binden, was mit einer vermuteten Funktion als Transkriptionsfaktor übereinstimmt.

3.5. Untersuchungen zu Signalpeptiden des SEC-Pathways in *Bacillus megaterium*

B. megaterium wird seit vielen Jahren erfolgreich für die Sekretion rekombinant produzierter Proteine eingesetzt (Korneli *et al.*, 2013). Dazu müssen die Proteine über ein N-terminales Signalpeptid verfügen, das den Transport einleitet und nach erfolgreichem Ausschleusen abgespalten wird. Die Effizienz mit der ein Protein sekretiert wird hängt stark von dem verwendeten Signalpeptid ab. Da diese Effizienz bisher bioinformatisch nicht vorhergesagt werden kann und von dem zu sekretierenden Protein abhängt, muss jedes Signalpeptid experimentell hinsichtlich Funktionalität und Effektivität getestet werden (Brockmeier *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Plasmidsystem entwickelt werden, mit dem der Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die Sekretion eines Proteins in *B. megaterium* untersucht werden kann. Die Funktionalität dieses entwickelten Signalpeptid-Testsystems sollte anschließend durch die Bestimmung der Sekretionseffizienz eines mit verschiedenen Signalpeptiden sekretierten Reporterproteins überprüft werden.

3.5.1. Konstruktion eines plasmidbasierten Signalpeptid-Testsystems

Für das hier konstruierte plasmidbasierte Signalpeptid-Testsystem wurde ein Aufbau gewählt, der zur Identifikation von optimalen Kombinationen aus Signalpeptid und zu sekretierendem Protein einen einfachen und standardisierten Austausch sowohl der verschiedenen Signalpeptide als auch des zu sekretierenden Proteins erlaubt, während das Plasmidgerüst unverändert bleibt. Die Produktion und Sekretion eines rekombinanten Proteins wird somit nur vom Signalpeptid beeinflusst und erlaubt eine Aussage über dessen Funktionalität. Die Menge an sekretiertem Protein ermöglicht dabei eine direkte Aussage über die Effizienz mit der ein Protein bedingt durch verschiedene N-terminal fusionierte Signalpeptide sekretiert wird. Die Konstruktion des Plasmidsystems erfolgte ausgehend von dem für *B. megaterium* DSM-319 etablierten Expressionsplasmid p3STOP1623hp (Stammen *et al.*, 2010). Hierbei handelt es sich um einen „Shuttlevektor“, der sowohl die Klonierung in *E. coli* als auch die Produktion von Proteinen in *B. megaterium* erlaubt. Die Expression eines rekombinanten Gens liegt unter der Kontrolle des für die rekombinante Proteinproduktion optimierten *xylA*-Promotors und wird durch die Zugabe von Xylose in das Medium induziert (Stammen *et al.*, 2010). Downstream des Promotors befindet sich eine „multiple cloning site“ (MCS 1) mit verschiedenen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (Malten *et al.*, 2006). Um nun im Rahmen des Testsystems für Signalpeptide eine einfache Klonierung zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit über ein Oligonukleotid eine zweite „multiple cloning site“ (MCS 2) in das Plasmid eingebracht. Diese MCS 2 erweitert das Spektrum an Restriktionsschnittstellen und erlaubt so für die Klonierung des 3'-Endes des Gens, das für

das zu sekretierende Protein codiert, aus sechs verschiedenen Restriktionsenzymen zu wählen. Darüber hinaus wurde über das Oligonukleotid die codierende Sequenz für einen His-Tag eingebracht (6x Histidin). Dadurch kann eine translationale Fusion dieses Tags an den C-Terminus des zu sekretierenden Proteins erzeugt werden. Diese erlaubt eine affinitätschromatographische Reinigung oder auch eine immunhistochemische Detektion des sekretierten Proteins (Abb. 3.5.1.A). Das erstellte Plasmid wurde als p3STOP1623hp-MCS-HIS bezeichnet.

Um sowohl die codierende DNA-Sequenz des Signalpeptids als auch des zu sekretierenden Proteins als separate Elemente in die MCS 1 bzw. MCS 2 klonieren zu können, muss eine Restriktionsschnittstelle zwischen diesen beiden Bereichen vorhanden sein (Abb. 3.5.1.B). Handelt es sich bei dieser um eine aus sechs Basen bestehende Erkennungssequenz, kommt es auf Proteinebene zu einer Insertion von zwei Aminosäuren zwischen Signalpeptid und zu sekretierendem Protein, wobei diese nach der Sekretion und Prozessierung das N-terminale Ende des sekretierten Proteins darstellen und sich somit an der sogenannte +1 und +2 Position relativ zur Signalpeptidase Schnittstelle befinden. Somit haben sie zum einen Einfluss auf die Aktivität der Signalpeptidase I, deren Aktivität von den C-terminalen Aminosäuren des Signalpeptids an den Positionen -3, -2, -1 sowie auch der Aminosäure an Position +1, der N-terminalen Aminosäure des Proteins, abhängig ist (Tjalsma *et al.*, 2004). Da sie außerdem nach der Abspaltung des Signalpeptids am sekretierten Protein verbleiben, können sie auch Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins haben.

Daher wurde für diese Restriktionsschnittstelle die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NgoMIV* und dessen Isoschizomers *NaeI* ausgewählt. Aus der DNA-Erkennungssequenz (gccggc) ergeben sich die beiden Aminosäuren Alanin (gcc; +1 Position) und Glycin (ggc; +2 Position). Da es sich bei Alanin und Glycin um kleine und ungeladene Aminosäuren handelt, sollte hier der geringste Effekt durch sterische Hinderung oder andere Wechselwirkungen auf das sekretierte Protein zu erwarten sein. Des Weiteren wurde für beide Aminosäuren beschrieben, dass sie keinen negativen Einfluss auf die Signalpeptidase I Aktivität und somit auf die Abspaltung des Signalpeptids vom zu sekretierenden Protein haben (Abb. 3.5.1.C) (Tjalsma *et al.*, 2000; Tjalsma *et al.*, 2004).

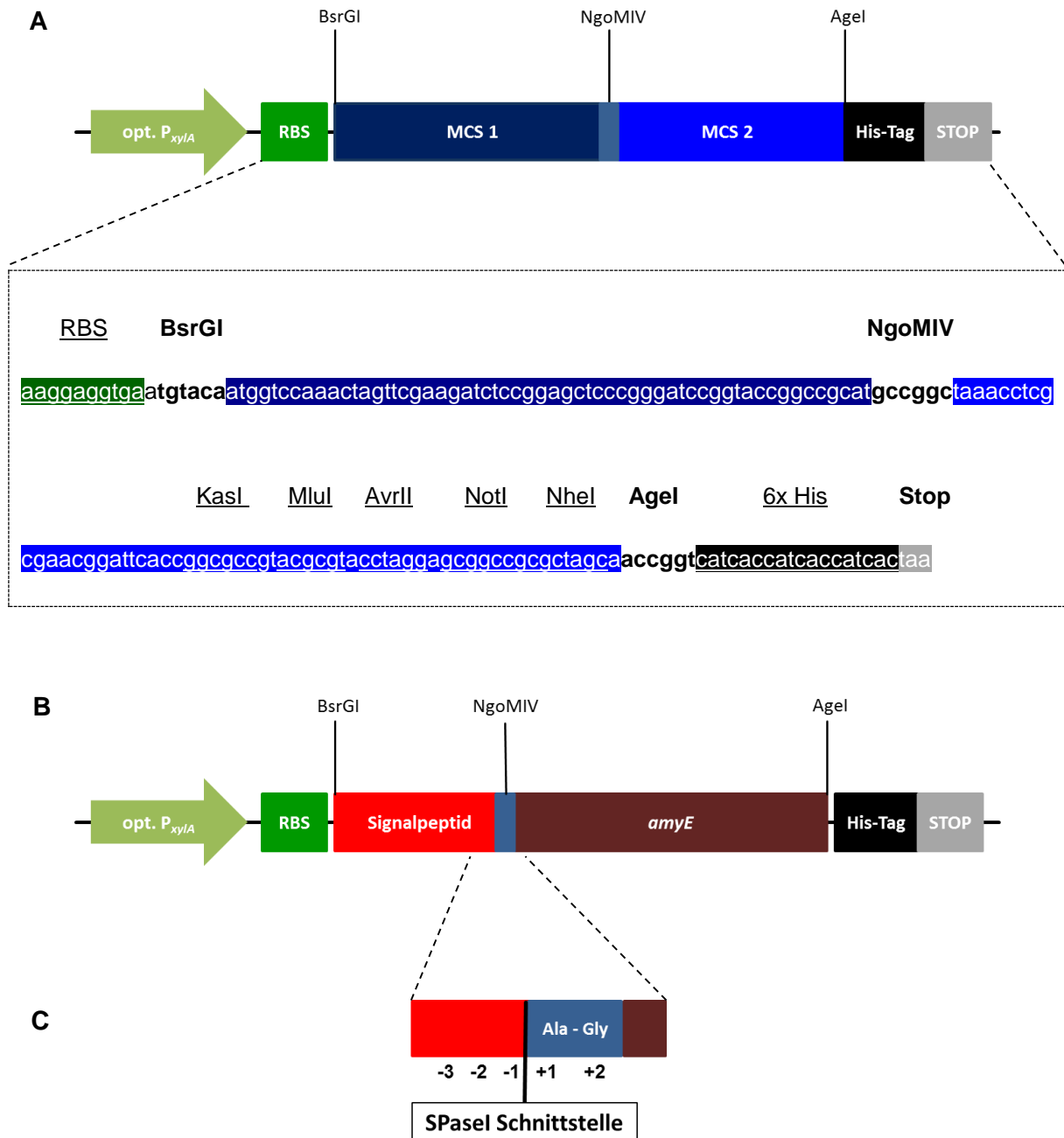


Abbildung 3.5.1: Schematische Übersicht über die zentralen Elemente des Plasmid-Testsystems für Signalpeptide. In (A) ist der für die Klonierung wichtige Teil des Ausgangsplasmids p3STOP1623hp-MCS-HIS dargestellt. In dem gestrichelten Kasten ist die vollständige DNA-Sequenz des markierten Ausschnitts (gestrichelte Linien) mit den wichtigsten Elementen angegeben. In Teil (B) ist das Plasmid mit codierenden DNA-Sequenzen für ein Signalpeptid und dem für die α -Amylase AmyE codierenden Gen *amyE* dargestellt. Teil (C) zeigt schematisch den durch die gestrichelten Linien markierten Bereich aus Teil (B) auf Aminosäureebene mit der Signalpeptidase I (SPaseI) Schnittstelle und den relevanten Aminosäuren an den Positionen -3, -2, -1, die durch das Signalpeptid codiert sind, sowie +1 und +2, die durch die NgoMIV Schnittstelle vorgegeben sind.

Um die Funktionalität des entwickelten Plasmid-Testsystems für Signalpeptide in *B. megaterium* DSM-319 überprüfen zu können, sollte die α -Amylase AmyE aus *B. subtilis* 168 mit Hilfe verschiedener Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM-319 sekretiert werden. Bei Amylasen handelt es sich um ein etabliertes Reportersystem, das sowohl eine Screening in Flüssigkultur als auch auf Stärke enthaltendem LB-Agar im Plattenformat ermöglicht. Dabei katalysiert die α -Amylase AmyE eine enzymatische Reaktion, bei der α -(1-4)-glykosidische Bindungen von Polysacchariden endohydrolytisch gespalten werden. Diese Enzymaktivität lässt sich auf unterschiedliche Weisen nachweisen und quantifizieren. Das für die α -Amylase codierende Gen *amyE* wurde ohne sein natives Signalpeptid so in das Ausgangsplasmid des Testsystems kloniert (p3STOP1623hp-MCS-HIS), dass anschließend die ausgewählten Signalpeptide einzeln upstream von *amyE* eingebracht werden konnten (Abb. 3.5.1 und 3.5.2).

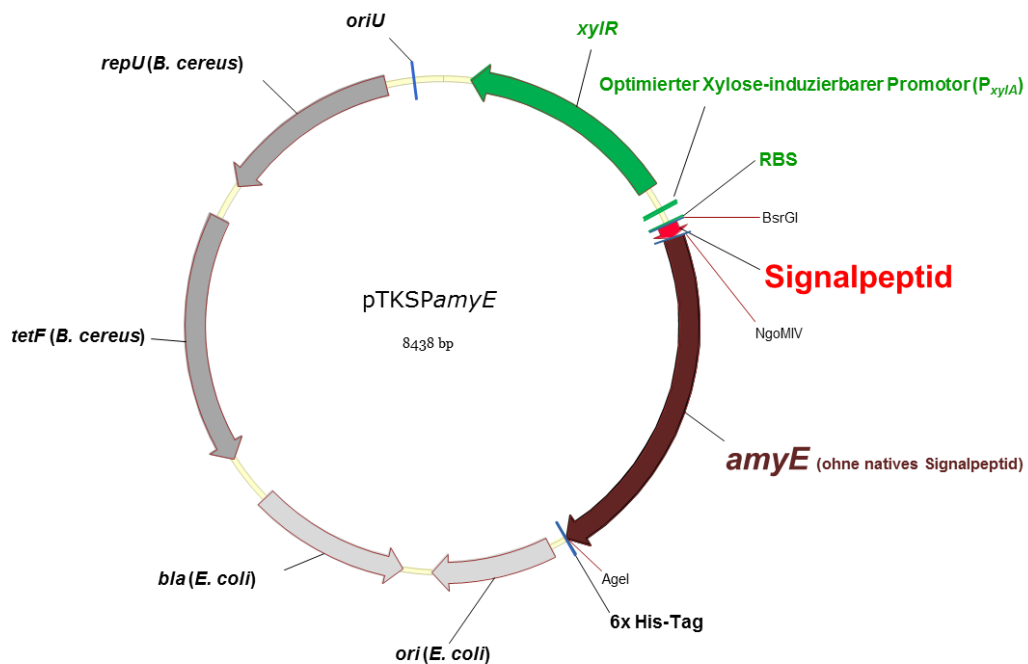


Abbildung 3.5.2. Allgemeine Karte der Plasmide zur Untersuchung der Sekretionseffizienz der α -Amylase AmyE mit verschiedenen Signalpeptiden. Die einzelnen Elemente des Plasmids sind schematisch als Blockpfeile dargestellt. Die Funktion der Elemente kann der Beschriftung entnommen werden. Dabei sind funktionelle Elemente für die Klonierung in *E. coli* hellgrau, die für die Replikation und Sekretion in *B. megaterium* dunkelgrau angegeben. Die Elemente des Xylose-induzierbaren Promotorsystems (*xyIR*, P_{xyIA} und die Ribosomenbindestelle (RBS)) sind grün angegeben. Das jeweils zu untersuchende Signalpeptid ist als roter Blockpfeil dargestellt. Die als Reporter dienende α -Amylase AmyE ist als *amyE* Gen downstream des Signalpeptids codiert. Die für die Klonierung der jeweiligen Signalpeptide genutzten Restriktionsschnittstellen BsrGI und NgoMIV sowie die für die Klonierung vom *amyE* genutzte Restriktionsschnittstelle Agel sind angegeben.

3.5.2. Identifizierung der Signalpeptide des SEC-Pathways von *Bacillus megaterium* DSM-319

Zur Identifizierung aller im Genom von *B. megaterium* DSM-319 codierten Signalpeptide des SEC-Pathways wurden zunächst alle annotierten „open reading frames“ (ORFs) bioinformatisch auf das Vorliegen von Signalpeptiden untersucht (Boyke Bunk, DSMZ Braunschweig; persönliche Kommunikation). Die ORFs wurden aus der *B. megaterium* Genom Datenbank „Megabac“ (Version 9; <http://megabac.tu-bs.de>) entnommen. Die bioinformatische Vorhersage erfolgte mit dem Web-basierten Programm „SignalP 4.0“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Petersen *et al.*, 2011). Das Programm analysiert hierfür standardmäßig die 70 N-terminalen Aminosäuren eines Proteins auf das Vorliegen von konservierten Motiven. Da die in *B. subtilis* und anderen Arten bisher identifizierten Signalpeptide eine Länge von <70 Aminosäuren aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass so auch bei *B. megaterium* DSM-319 alle Signalpeptide erfasst werden (Tjalsma *et al.*, 2004; Mathiesen *et al.*, 2008). Diese Aminosäuresequenz wird zum einen auf die bei Signalpeptiden konservierten Regionen, die N-terminale positiv geladene „N-Region“, die zentrale hydrophobe „H-Region“ und die polare C-terminale „C-Region“, analysiert. Zum anderen wird die Sequenz auf die Konsensus-Erkennungssequenz der Signalpeptidase I in der „C-Region“ (A-X-A; A: Alanin, X: beliebige Aminosäure) überprüft. Auf Basis dieser Parameter wird von dem Programm der sogenannte D-Wert („discrimination score“) berechnet, der zur Unterscheidung zwischen Signalpeptiden und „nicht-Signalpeptiden“ verwendet wird. Der D-Wert gibt somit die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Aminosäuresequenz als Signalpeptid fungiert. Als Grenzwert zwischen Signalpeptiden und „nicht-Signalpeptiden“ wird von dem Programm SignalP 4.0 standardmäßig ein D-Wert von 0,45 vorgegeben, wobei Werte >0,45 als Signalpeptid gewertet werden. Dieser Grenzwert von 0,45 wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Er soll den bestmöglichen Kompromiss zwischen „falsch“- und „korrekt-positiven“ Ergebnissen darstellen. Das Ergebnis der Analyse einer Aminosäuresequenz ist beispielhaft in Abbildung 3.5.3 dargestellt.

Bei der Analyse mit SignalP wurde zunächst nicht zwischen Signalpeptiden, die von der Signalpeptidase I (sekretierte Proteine), und solchen, die von der Signalpeptidase II (Lipoproteine; Membran-gebunden) erkannt und abgespalten werden, unterschieden, da beide über den SEC-Pathway sekretiert werden. So wurden im Genom von *B. megaterium* DSM-319 insgesamt 308 Proteine mit Signalpeptiden des SEC-Pathways vorhergesagt.

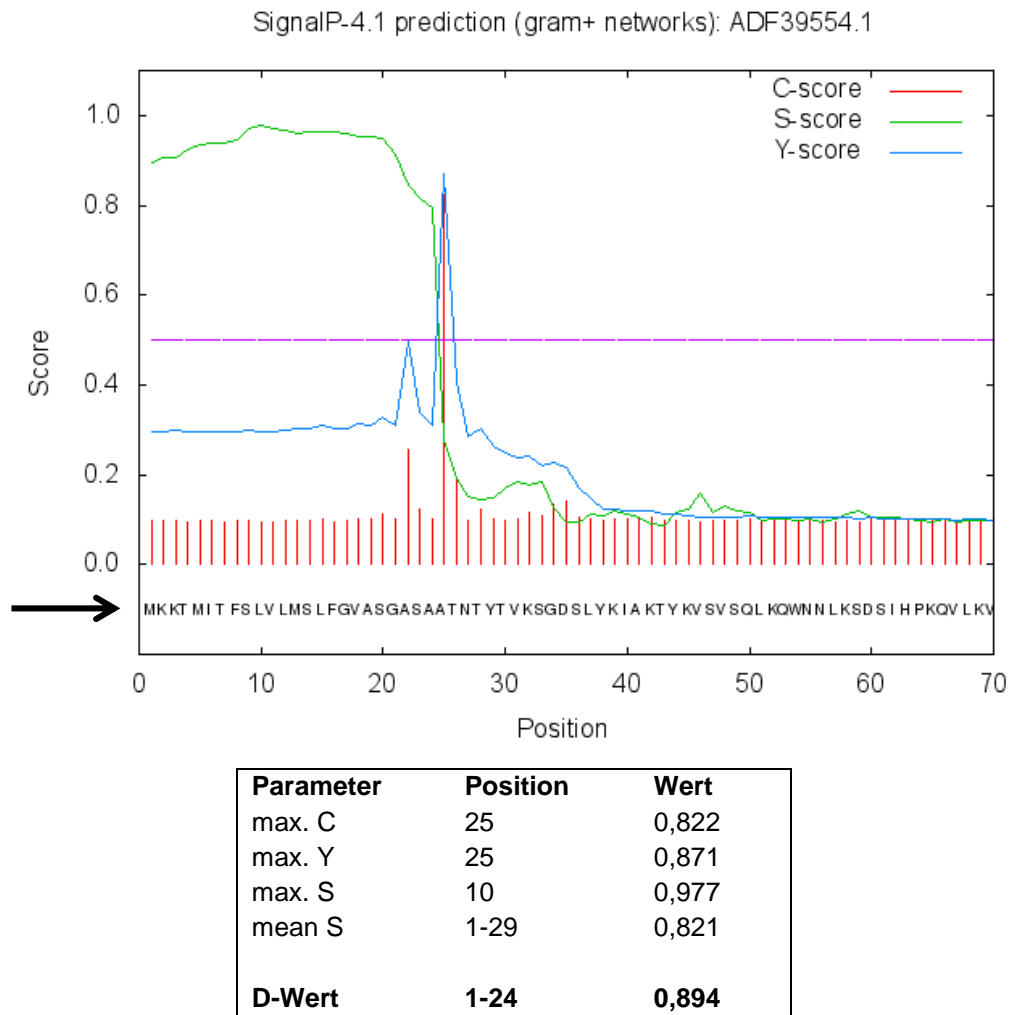


Abbildung 3.5.3: Ergebnis der Sequenzanalyse einer Aminosäuresequenz mit SignalP 4.0 (hier am Beispiel von: „conserved hypothetical protein“, ADF39554.1 → pTKSPamyE1). In der mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichneten Reihe des oberen Diagramms ist die Aminosäuresequenz samt Positionen hinsichtlich der ersten translatierten Aminosäure angegeben (x-Achse). Die roten vertikalen Striche kennzeichnen den sogenannten C-score („cleavage site score“) der jeweiligen Aminosäure. Die Aminosäure mit dem höchsten C-score stellt die erste Aminosäure nach der Signalpeptidase Schnittstelle dar (N-terminale Aminosäure des sekretierten Proteins). In diesem Fall handelt es sich um die Aminosäure an Position 25 (Alanin) mit einem C-score von 0,822 (siehe Tabelle: max. C Position). Der grüne Graph stellt den sogenannten S-score („signal peptide score“) der Aminosäuresequenz dar. Er gibt eine Aussage über den Vergleich der Aminosäuresequenz mit der Konsensussequenz von Signalpeptiden auf Basis der konservierten Regionen (N-region, H-region, C-region). Die blaue Kurve bildet den Y-score ab („combined cleavage site score“). Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus C-score und S-score zur Vorhersage der Signalpeptidase Schnittstelle. In der Tabelle (unten) sind die Parameter samt Position und zugehörigem Wert angegeben. Der D-Wert („discrimination score“) ist eine Kombination aus „mean S“ und „Y-score“ zur Vorhersage eines Signalpeptids und stellt den ausschlaggebenden Parameter zur Vorhersage einer Signalpeptids dar. Für die hier dargestellte Aminosäuresequenz konnte also ein Signalpeptid mit einem D-Wert von 0,894, einer Länge von 24 Aminosäuren und der Aminosäuresequenz MKKTMITFSLVLSLFGVASGASA identifiziert werden. Die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase ergibt sich aus den Positionen von -3 bis +1 der Schnittstelle, hier also die Aminosäuresequenz ASA-A (entspricht somit exakt der AXA-A Konsensussequenz).

Die 308 identifizierten Signalpeptide des SEC-Pathways zeigten D-Werte zwischen 0,894 und 0,451 auf. Dabei waren die D-Werte der einzelnen Signalpeptide über diesen gesamten Bereich annähernd gleich verteilt (Abb. 3.5.4).

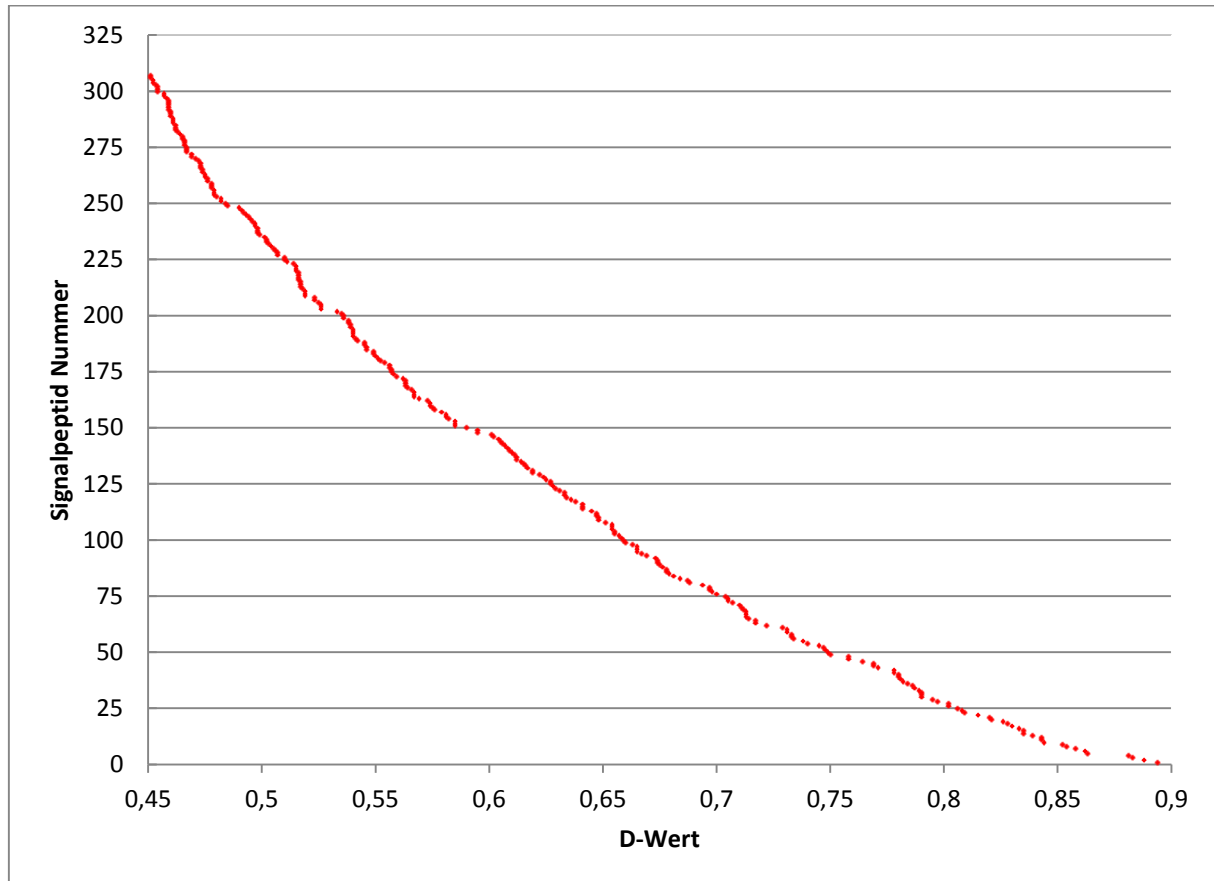


Abbildung 3.5.4: Verteilung der D-Werte aller Signalpeptide. Alle annotierten ORFs von *B. megaterium* DSM-319 wurden mit dem Programm SignalP 4.0 auf Signalpeptide des SEC-Pathways analysiert. Für die 308 identifizierten Signalpeptide (Y-Achse) sind die jeweiligen D-Werte (X-Achse) dargestellt. Jeder Punkt in der Abbildung stellt ein Signalpeptid dar. Die Signalpeptidnummern wurden aufsteigend nach absteigendem D-Wert gewählt.

Die Sequenzen der einzelnen Signalpeptide wurden aus den Sequenzen der als sekretiert vorhergesagten Proteine abgeleitet. Als N-terminale Aminosäure des Signalpeptids wurde dabei die N-terminale Aminosäure des gesamten Proteins definiert (in der Regel Methionin). Die Bestimmung der C-terminalen Aminosäure erfolgte mit Hilfe des von SignalP 4.0 ausgegebenen Parameters „max. C Position“ (Abb. 3.5.3). Dieser Parameter bezeichnet die Position der N-terminalen Aminosäure des sekretierten Proteins nach Abspaltung des Signalpeptids (+1 Position der Signalpeptidase I Schnittstelle). Somit ist die in N-terminaler Richtung davor liegende Aminosäure die C-terminale Aminosäure des Signalpeptids (-1 Position der Signalpeptidase I Schnittstelle) (Abb. 3.5.1). An den für die Signalpeptidase-Schnittstelle relevanten Positionen -3, -2 und -1 bleiben daher die nativen Aminosäuren des jeweiligen Signalpeptids erhalten. Die ebenfalls relevante Aminosäure an der +1 Position

wurde jedoch für jedes Signalpeptid durch die gewählte Klonierungsstrategie artifiziell als Alanin definiert (Abb. 3.5.1). Des Weiteren ist zu beachten, dass eventuelle alternative Schnittstellen für Signalpeptidasen, die in C-terminaler Richtung der „max. C Position“ liegen auf diese Weise nicht erfasst worden sind.

Die für die Signalpeptide codierenden DNA-Sequenzen wurden aus genomischer DNA von *B. megaterium* DSM-319 amplifiziert, wodurch sich jeweils die für *B. megaterium* native codon-usage für die Signalpeptide ergab.

Zusätzlich zu diesen Signalpeptiden wurde die codierende Sequenz des Signalpeptids der extrazellulären Esterase LipA aus *B. megaterium* in Codon-optimierter Form in das Plasmid-Testsystems eingebracht und getestet. Dieses Signalpeptid wurde in vorherigen Arbeiten zur rekombinanten Produktion extrazellulärer Proteine in *B. megaterium* genutzt (Malten *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2007; Stammen *et al.*, 2010) und sollte daher als Referenz für die übrigen untersuchten Signalpeptide dienen.

3.5.3. Untersuchungen zur Funktionalität und Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die Sekretion rekombinanter α -Amylase in *Bacillus megaterium*

Zur Bestimmung der Funktionalität des entwickelten Signalpeptid-Testsystems und zum Vergleich des Einflusses ausgewählter Signalpeptide auf die Sekretion der rekombinant produzierten α -Amylase AmyE wurde eine Auswahl an Konstrukte in *B. megaterium* getestet. Basierend auf der Menge an sekretierter AmyE sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den bioinformatisch ermittelten Parametern zur Vorhersage der Signalpeptide und der Effizienz, mit der die α -Amylase durch die N-terminale Fusion mit den jeweiligen Signalpeptiden sekretiert wird, ermittelt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Signalpeptide sind in Tabelle 3.5.1 dargestellt. Es wurden insgesamt 41 der 308 in *B. megaterium* DSM-319 identifizierten Signalpeptide kloniert und hinsichtlich der Sekretionseffizienz der rekombinant produzierten α -Amylase AmyE überprüft. Die Auswahl der Signalpeptide erfolgte ausschließlich unter Berücksichtigung des ermittelten D-Wertes (Tab. 3.5.2). Um eine repräsentative Aussage über den Zusammenhang von D-Wert und Sekretionseffizienz treffen zu können, wurden Signalpeptide untersucht, die über das gesamte Spektrum der D-Werte (0,894 – 0,451) verteilt sind (Abb. 3.5.4, Tab. 3.5.1).

Tabelle 3.5.1: Getestete Signalpeptide. Der Name der zur Bestimmung der Sekretionseffizienz verwendeten Plasmide setzt sich aus dem Präfix „pTKSPamyE“, gefolgt von der Nummer des Signalpeptids zusammen (Beispiel für das Signalpeptid 1 (SP1): pTKSPamyE1). Abweichend davon wurde das Plasmid für das Signalpeptid von LipA (SP LipA) als pTKSLipAamyE bezeichnet.

Signalpeptid	Proteinbezeichnung	D-Wert	GenBank ID
0	ohne Signalpeptid (Negativkontrolle)	-	-
LipA	extracellular esterase	0,846	CAD23620.1
1	conserved hypothetical protein	0,894	ADF39554.1
2	conserved hypothetical protein	0,839	ADF39788.1
3	putative peptidoglycan binding domain protein	0,806	ADF38755.1
4	putative protease, NlpC/P60 family	0,782	ADF40390.1
5	putative lipoprotein	0,75	ADF39262.1
6	sulfur-containing amino acid ABC transporter	0,729	ADF38874.1
8	putative lipoprotein YlaJ	0,679	ADF38206.1
9	hypothetical protein BMD_2542	0,665	ADF39387.1
10	Beta-amylase	0,648	ADF37268.1
11	conserved hypothetical protein	0,633	ADF37202.1
12	spore germination protein GerD	0,616	ADF37113.1
13	putative ABC transporter, substrate-binding protein	0,604	ADF39217.1
14	conserved hypothetical protein	0,579	ADF37265.1
15	levansucrase	0,563	ADF38395.1
16	peptidase, M23/M37 family	0,551	ADF41182.1
17	polysaccharide deacetylase	0,54	ADF38797.1
18	putative lipoprotein	0,526	ADF40084.1
19	hypothetical protein BMD_3197	0,516	ADF40037.1
20	pullulanase, type I	0,506	ADF38846.1
21	conserved hypothetical protein	0,497	ADF37472.1
22	hypothetical protein BMD_1921	0,48	ADF38774.1
24	hypothetical protein BMD_3923	0,466	ADF40755.1
26	spore cortex-lytic enzyme	0,835	ADF40060.1
27	conserved hypothetical protein	0,802	ADF39852.1
28	conserved hypothetical protein	0,781	ADF40379.1
29	conserved hypothetical protein	0,749	ADF40620.1
30	putative lipoprotein	0,722	ADF38943.1
31	putative oligopeptide ABC transporter	0,705	ADF39709.1
32	putative ferrichrome ABC transporter	0,678	ADF40056.1
33	conserved hypothetical protein	0,663	ADF37687.1
35	ferrichrome import ABC transporter	0,631	ADF38368.1
36	sporulation lipoprotein, YhcN/YlaJ family	0,615	ADF38262.1
37	putative lipoprotein	0,602	ADF40339.1
39	cytochrome c-551	0,563	ADF41878.1
42	hypothetical protein BMD_1675	0,525	ADF38531.1
43	methyl-accepting chemotaxis protein	0,516	ADF39301.1
44	bacterial SH3 domain protein	0,505	ADF40325.1
45	transcription regulator domain protein	0,496	ADF39988.1
47	penicillin-binding protein	0,473	ADF41520.1
48	spore germination protein GerA	0,466	ADF38064.1

Die Bestimmung der Sekretionseffizienz erfolgte über die Messung der Enzymaktivität der als Reporter verwendeten α -Amylase AmyE im zellfreien Kulturüberstand von *B. megaterium*. Dazu wurde *B. megaterium* MS-941 (DSM-319 $\Delta nprM$) mittels Protoplastentransformation individuell mit allen Plasmiden transformiert und unter Standardbedingungen (LB-Medium + 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin, 37°C, 250 rpm) in Schüttelkolben kultiviert. Die Genexpression der Signalpeptid-*amyE* Fusionskonstrukte wurde durch Zugabe von Xylose induziert und je 3 h und 6 h nach Induktion Proben genommen.

Zur Bestimmung der extrazellulären α -Amylase-Aktivität wurde ein Testkit verwendet, bei dem die Menge eines durch die α -Amylase freigesetzten Substrats photometrisch quantifiziert wird (Phadebas Amylase Test Kit (Magle Life Sciences; Lund, Schweden). Bei dem Substrat handelt es sich um ein blau gefärbtes, durch Quervernetzung wasserunlösliches Stärkepolymer. Die α -Amylase hydrolysiert das wasserunlösliche Stärkepolymer zu wasserlöslichen Fragmenten. Das wasserunlösliche Stärkepolymer wird von der wässrigen Lösung abgetrennt und die Absorption der bläulichen Lösung bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch bestimmt. Dabei ist die Absorption direkt proportional zur Aktivität der α -Amylase in der Probe und erlaubt so eine Aussage über die relative Menge an sekretierter α -Amylase. Da über die spezifische Aktivität der hier verwendeten α -Amylase AmyE aus *B. subtilis* keine Informationen vorliegen, wird im Folgenden die Absorption bei einer OD von 620 nm ($\text{OD}_{620\text{nm}}$) der wässrigen Lösung als Maß für die Menge an sekretierter α -Amylase und somit für die Sekretionseffizienz verwendet (Abb. 3.5.5) und als Amylaseaktivität bezeichnet.

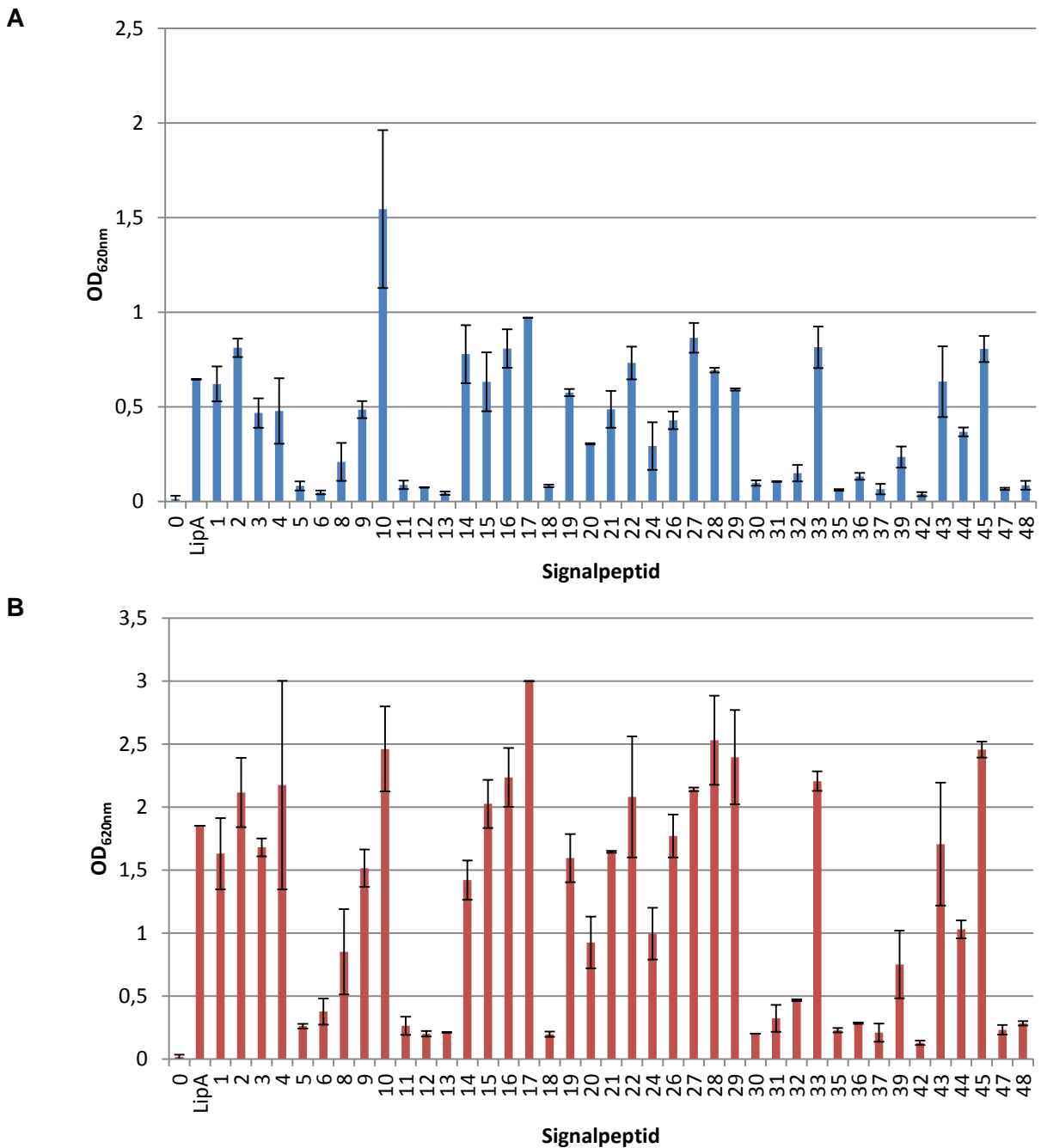


Abbildung 3.5.5. Einfluss der untersuchten Signalpeptide auf die Sekretion der rekombinanten α -Amylase AmyE 3 h (A) und 6 h (B) nach Induktion der Genexpression. Die rekombinante α -Amylase AmyE diente als Reporter, der durch die N-terminale Fusion mit dem jeweiligen Signalpeptid über den SEC-Pathway aus *B. megaterium* MS-941 in das Medium sekretiert werden sollte. Die Genexpression dieses plasmidcodierten Fusionskonstrukts wurde durch Zugabe von Xylose induziert und 3 h (A) und 6 h (B) nach Induktion Proben genommen. Dargestellt sind je die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten. Zur Bestimmung der Menge an sekretierter α -Amylase wurde die Amylaseaktivität im zellfreien Kulturüberstand photometrisch bestimmt. Dabei hydrolysiert die α -Amylase ein wasserunlösliche Stärkopolymer zu wasserlöslichen Fragmenten. Die Absorption dieser bläulichen Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Die Absorption ist direkt proportional zur Aktivität der α -Amylase und erlaubt so eine Aussage über die relative Menge an sekretierter α -Amylase. Die Absorption bei einer OD von 620 nm (OD_{620nm}) der wässrigen Lösung wurde als Maß für die Menge an sekretierter α -Amylase und somit für die Sekretionseffizienz verwendet und als Amylaseaktivität bezeichnet.

Bei der Negativkontrolle (*amyE*-Gen ohne Signalpeptidsequenz) wurde zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Amylaseaktivität im Kulturüberstand beobachtet (3 h: OD_{620nm} 0,0125; 6 h: OD_{620nm} 0,017). Die Fusion (SP-*amyE*) aller hier ausgewählten Signalpeptide hingegen zeigte eine AmyE Aktivität im Kulturüberstand, die mindestens ~2,8-fach über der Negativkontrolle lag. Die extrazelluläre Amylaseaktivität war für alle untersuchten Signalpeptiden 6 h nach Induktion der Genexpression zwischen ~693 % (SP 6) und ~59 % (SP 10) höher als 3 h nach Induktion, was auf eine kontinuierliche Sekretion der α -Amylase während der Kultivierung schließen lässt. Dabei wirkten sich die einzelnen Signalpeptide unterschiedlich auf die Amylaseaktivität aus. So konnte 3 h nach Induktion die höchste Amylaseaktivität für das Signalpeptid der β -Amylase (SP 10) mit einem OD_{620nm}-Wert von 1,545 festgestellt werden, während bedingt durch das Signalpeptid des hypothetischen Proteins BMD_1675 (SP 42) mit einem OD_{620nm}-Wert von 0,0358 nur ~2,31 % der höchsten Aktivität gemessen wurde. Die β -Amylase aus *B. megaterium* DSM-319 zeigt 33% Sequenzhomologie zur α -Amylase AmyE aus *B. subtilis*. Durch eine damit eventuell verbundene ähnliche Struktur von AmyE und der β -Amylase könnte AmyE vergleichbare Wechselwirkungen mit dem Signalpeptid der β -Amylase wie die β -Amylase selbst eingehen. Daher könnte das Signalpeptid, das eine effiziente Sekretion der β -Amylase bewirken sollte, auch zu einer effizienten Sekretion der α -Amylase führen.

6 h nach Induktion der Genexpression wurde die höchste Amylaseaktivität für das Signalpeptid der Polysaccharid Deacetylase (SP 17) mit einem OD_{620nm}-Wert von 3,0 gemessen, was eine ~209 % Steigerung zum 3 h Wert darstellte, wobei die geringste Aktivität, wie auch beim 3 h Messpunkt, für das Signalpeptid des hypothetischen Proteins BMD_1675 (SP 42) mit einem OD_{620nm}-Wert von 0,1285 (~233 % gesteigert) bestimmt wurde. Das Signalpeptid 42 gehört zu einer Reihe von Signalpeptiden (SP 5, 6, 11, 12, 13, 18, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 42, 47, 48), die mit einer Amylaseaktivität von OD_{620nm} < 0,150 3 h und OD_{620nm} < 0,467 6 h nach Induktion zu einer deutlich geringeren Amylaseaktivität als die übrigen Signalpeptide führten. Bei einer genaueren Sequenzanalyse dieser Signalpeptide wurde festgestellt, dass diese Signalpeptide zusätzlich zu der zuvor identifizierten Signalpeptidase I Schnittstelle eine Schnittstelle für die Signalpeptidase II (SPasell) aufweisen (Liste der Signalpeptide siehe Tabelle 3.5.2). Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Web-basierten Programm „LipoP 1.0“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) (Juncker *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2008). Diese SPasell Schnittstelle ist charakteristisch für Signalpeptide von Lipoproteinen (Tjalsma *et al.*, 2000; Tjalsma *et al.*, 2004). Lipoproteine werden ebenfalls über den SEC-Pathway aus der Zelle transportiert, werden dann jedoch von der SPasell erkannt und verbleiben über einen Aminosäureanker an der Zellmembran gebunden. Da die Bestimmung der Amylaseaktivität in dieser Arbeit mit zellfreiem

Kulturüberstand erfolgte, lässt sich somit die verhältnismäßig geringe Amylaseaktivität bei den Signalpeptiden von Lipoproteinen erklären.

Das in bisherigen Arbeiten zur extrazellulären Proteinproduktion in *B. megaterium* verwendete Signalpeptid der extrazellulären Esterase LipA (SP LipA) führte 3 h nach Induktion zu einer Amylaseaktivität von OD_{620nm} 0,645 und nach 6 h zu einer um ~186,82 % erhöhten Aktivität (OD_{620nm} 1,85). Damit gehörte es zu der Gruppe der Signalpeptide, welche die höchste Amylasesekretion ergaben, wobei allerdings zu beiden Zeitpunkten andere Signalpeptide eine stärkere Sekretion der α -Amylase bewirkten.

Insgesamt zeigen die Unterschiede in der extrazellulären Amylaseaktivität, dass die Wahl des Signalpeptids auch in *B. megaterium* einen großen Einfluss auf die Sekretionseffizienz eines rekombinanten Proteins und somit die Produktausbeute hat.

3.5.4. Sequenzanalyse der getesteten Signalpeptide

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem bioinformatisch ermittelten D-Wert und der gemessenen Sekretionseffizienz der getesteten Signalpeptide zu untersuchen, wurden die Signalpeptide anhand ihres D-Werts sortiert und bezüglich der Menge an sekretierter α -Amylase 6 h nach Induktion der Genexpression verglichen (Abb.3.5.6). Hierbei wurden sowohl Signalpeptide, die von der Signalpeptidase I, als auch von der Signalpeptidase II (Lipoproteine) erkannt werden, berücksichtigt.

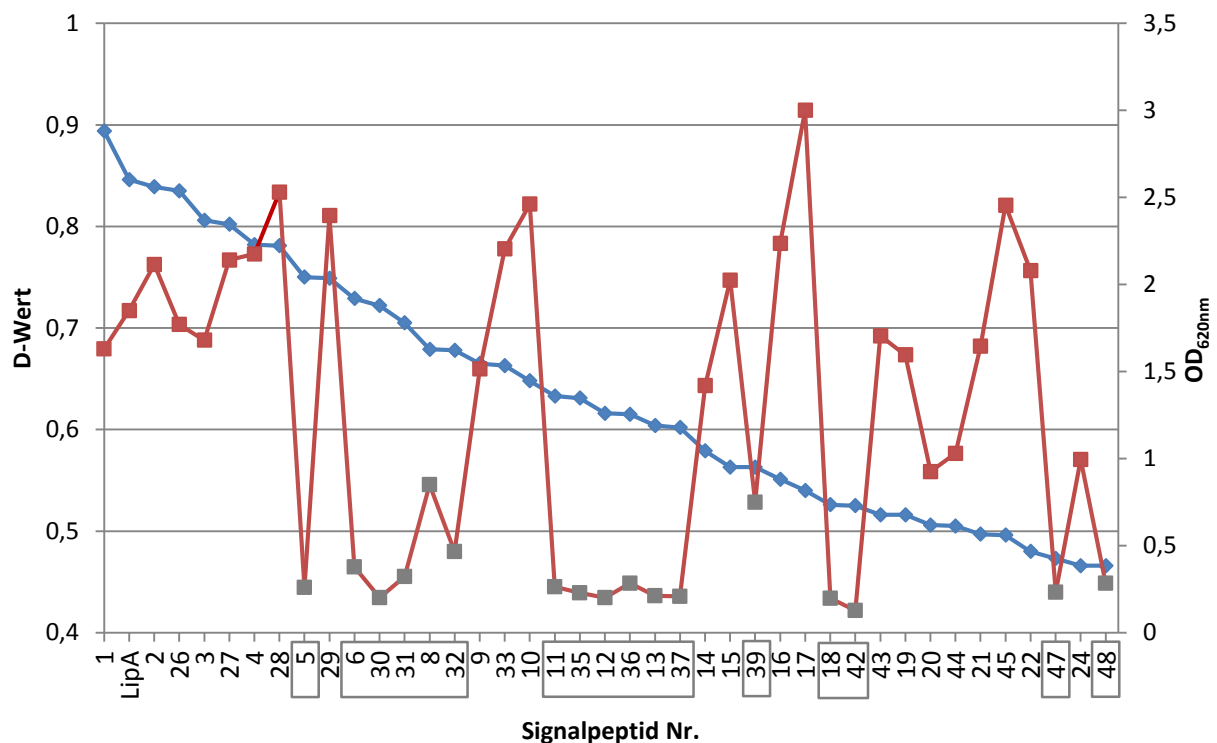


Abbildung 3.5.6. Zusammenhang zwischen D-Wert und Menge an sekretierter α -Amylase der untersuchten Signalpeptide. Die untersuchten Signalpeptide (siehe Beschriftung der horizontalen Achse) wurde in absteigender Reihenfolge nach ihrem D-Wert angeordnet (blaue Punkte, linke vertikale Achse). Dazu ist die gemessene Amylaseaktivität 6 h nach Induktion der Genexpression jedes Signalpeptids dargestellt (rote bzw. graue Punkte, rechte vertikale Achse). Signalpeptide die eine Signalpeptidase II Schnittstelle aufweisen und somit als Lipoproteine klassifiziert wurden, sind in der Beschriftung der horizontalen Achse mit einem grauen Kasten und die Datenpunkte der Amylaseaktivität als graue Punkte gekennzeichnet.

Die Analysen zeigten, dass 6 h nach Induktion der Genexpression kein Zusammenhang zwischen dem D-Wert eines Signalpeptids und der Sekretionseffizienz der α -Amylase AmyE festgestellt werden konnte. So zeigte das Signalpeptid der Polysaccharid Deacetylase (SP 17), das zur stärksten AmyE Sekretion führte, einen D-Wert von 0,54 und liegt somit nur geringfügig über dem Schwellenwert des D-Wertes von 0,45. Das Signalpeptid des „conserved hypothetical protein“, ADF39554.1 (SP 1) mit dem höchsten D-Wert (0,894)

fürte hingegen zu einer um ~46% verringerten Sekretion im Vergleich zu SP 17. Entsprechende Analysen 3 h nach Induktion zeigten ein ähnliches Ergebnis, wobei die Unterschiede in der Sekretionseffizienz für die Signalpeptide der zwei verschiedenen Klassen (SPasel und SPaselI) weniger deutlich war (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ließ sich kein Zusammenhang zwischen D-Wert und Sekretionseffizienz feststellen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der D-Wert auch bei *B. megaterium* keine Aussage über die Effizienz mit der ein Protein sekretiert wird zulässt, sondern lediglich eine Aussage über die wahrscheinliche Funktion einer Aminosäuresequenz als Signalpeptid gibt. Abschließend wurden die übrigen verfügbaren Informationen über die Signalpeptide mit Hinblick auf einen Zusammenhang mit der Sekretionseffizienz untersucht (siehe Kapitel 3.5.3). Dabei wurde die Länge der Signalpeptide (in Aminosäuren), die Sequenz der SPasel Schnittstelle, der max. C-Wert, max. Y-Wert, max. S-Wert und mean S-Wert berücksichtigt (Abb. 3.5.3). Die jeweiligen Werte und die zugehörigen Signalpeptide sind in Tabelle 3.5.2 dargestellt.

Tabelle 3.5.2. Verfügbare Parameter für die untersuchten Signalpeptide. Die hier dargestellten Parameter wurden bei der Sequenzanalyse der Signalpeptide mit dem Programm SignalP 4.0 ermittelt. Die Signalpeptide sind in absteigender Sekretionseffizienz der α -Amylase AmyE angeordnet.

SP	OD _{620nm} (t = 6 h) relative Amylaseaktivität	D-Wert	Anzahl Aminosäuren	SPasel Schnittstelle	max. C	max. Y	max. S	mean S
17	3	0,54	36	SES-A	0,335	0,446	0,839	0,687
28	2,53	0,781	29	AEA-K	0,621	0,716	0,957	0,882
10	2,461	0,648	31	AAA-V	0,437	0,566	0,901	0,776
45	2,455	0,496	31	TSA-K	0,26	0,388	0,789	0,664
29	2,395	0,749	36	AHA-A	0,756	0,717	0,906	0,799
16	2,235	0,551	30	VKA-E	0,805	0,658	0,64	0,384
33	2,205	0,663	23	AFA-P	0,432	0,578	0,913	0,796
4	2,175	0,782	32	ASA-N	0,546	0,697	0,983	0,914
27	2,14	0,802	30	SSA-S	0,682	0,764	0,951	0,862
2	2,115	0,839	25	ANA-E	0,757	0,805	0,964	0,892
22	2,08	0,48	28	ATG-D	0,227	0,338	0,904	0,701
15	2,025	0,563	29	TFA-K	0,286	0,437	0,933	0,76
26	1,77	0,835	28	ASA-A	0,683	0,792	0,953	0,902
43	1,705	0,516	36	VSA-Y	0,312	0,428	0,827	0,654
3	1,68	0,806	30	EAA-A	0,651	0,74	0,976	0,91
21	1,645	0,497	30	YSG-R	0,13	0,296	0,856	0,812
1	1,63	0,894	24	ASA-A	0,822	0,871	0,977	0,93
19	1,595	0,516	22	VCA-A	0,454	0,476	0,786	0,578
9	1,515	0,665	28	SLA-S	0,416	0,57	0,9	0,812
14	1,42	0,579	31	AEA-D	0,422	0,546	0,857	0,632
44	1,03	0,505	44	ASA-A	0,484	0,483	0,718	0,539
24	0,995	0,466	20	GYA-V	0,158	0,326	0,767	0,686
20	0,925	0,506	56	ASA-A	0,594	0,592	0,714	0,371

3. Ergebnisse und Diskussion

SP	OD _{620nm} (t = 6 h) relative Amylaseaktivität	D-Wert	Anzahl Aminosäuren	SPasel Schnittstelle	max. C	max. Y	max. S	mean S
Signalpeptide von Lipoproteinen (SPasel)								
8	0,851	0,679	23	NQA-D	0,593	0,647	0,831	0,73
39	0,75	0,563	36	ASA-D	0,244	0,412	0,919	0,801
32	0,4665	0,678	25	QGA-K	0,332	0,537	0,969	0,899
6	0,377	0,729	28	ETA-A	0,531	0,656	0,947	0,844
31	0,3225	0,705	25	ANS-A	0,345	0,561	0,984	0,931
36	0,284	0,615	26	DQG-K	0,281	0,47	0,933	0,841
48	0,2835	0,466	20	ADR-E	0,153	0,314	0,854	0,703
11	0,2645	0,633	19	ACA-P	0,202	0,435	0,965	0,941
5	0,26105	0,75	22	ACS-A	0,416	0,627	0,966	0,942
47	0,232	0,473	28	QKA-Q	0,236	0,373	0,721	0,629
35	0,2285	0,631	28	SKN-D	0,351	0,508	0,949	0,822
13	0,2115	0,604	24	AGK-Q	0,221	0,438	0,926	0,863
37	0,2095	0,602	26	ASK-E	0,233	0,436	0,946	0,862
30	0,201	0,722	26	DDA-A	0,422	0,614	0,966	0,892
12	0,2005	0,616	22	ACA-P	0,244	0,464	0,926	0,854
18	0,197	0,526	22	ACS-T	0,144	0,351	0,93	0,801
42	0,1285	0,525	25	SGK-K	0,159	0,349	0,929	0,802

Bei der Untersuchung konnte, wie bereits beim D-Wert, kein Zusammenhang zwischen den betrachteten Parametern und der Sekretionseffizienz festgestellt werden. Somit reichen die bislang verfügbaren bioinformatischen Methoden nicht aus, um auf eine experimentelle Ermittlung der optimalen Paarung von Signalpeptid und rekombinantem Protein zu verzichten, um höchste Proteinausbeuten zu erzielen. Dafür bietet nun das in dieser Arbeit für *B. megaterium* entwickelte Signalpeptid-Testsystem eine geeignete Möglichkeit.

4. Zusammenfassung

Das Bodenbakterium *Bacillus megaterium* wurde während der letzten 15 Jahre systematisch für die Produktion rekombinanter Proteine im Gramm pro Liter Maßstab und deren Export ins Wachstumsmedium entwickelt. Dabei sind zwei Prozesse, das Einbringen von DNA mittels Transformation und der Proteinexport mittels des SEC Exportsystems, limitierend für den Gesamtprozess. *B. megaterium* besitzt die Gene für ein natürliches Kompetenz-, also DNA-Aufnahmesystem, zeigt aber keine natürliche Kompetenz.

So wurden zuerst neun *B. megaterium* Wildtyp-Stämme auf natürliche Kompetenz hin untersucht, allerdings ohne Erfolg. Offensichtlich erfolgt die Regulation der Kompetenzgene in *B. megaterium* deutlich anders als im sehr gut transformierbaren Modellorganismus *Bacillus subtilis*. Um die Promotoraktivitäten der Kompetenzgene von *B. megaterium* zu analysieren, wurde zuerst das bakterielle Luziferase System als Reportersystem als sensitive Alternative zu dem bisher genutzten grünfluoreszierenden Protein (Gfp) erfolgreich etabliert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Kompetenz-assoziierten Gene *comGABCEFG*, *comFA*, *comK* und *ssbB* Wachstumsphasen- und Substrat-abhängig ist und durch die extrazelluläre Protease NprM negativ beeinflusst wird. Sich anschließende Transkriptomanalysen zeigten, dass NprM die Expression von 76 Genen direkt oder indirekt reguliert. So wurde das Gen des globalen Übergangszustands-Regulators AbrB in einer *nprM*-Deletionsmutante ~13-fach geringer transkribiert. Gleichzeitig war diese Mutante über etablierte Methoden besser transformierbar als der Wildtyp. Durch *in silico* Analysen konnte ComK_{Bmeg}, das eine Homologie zu dem zentralen Regulator der natürlichen Kompetenz in *B. subtilis* (ComK_{Bsub}) aufweist, der Gruppe der ComK2 Proteine zugeordnet werden, deren Funktion sich von ComK_{Bsub} unterscheidet. In dieser Arbeit gelang die rekombinante Produktion und Reinigung von ComK_{Bmeg}, was in Zukunft eine proteinbiochemische Untersuchung und Aufklärung der Funktion erlaubt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden im Genom von *B. megaterium* 308 Signalpeptide, die den Transport von Proteinen über den SEC-Pathway bewirken, bioinformatisch identifiziert, analysiert und klassifiziert. Um Funktionalität und Effektivität *in vivo* für die Sekretion rekombinanter Proteine zu untersuchen, wurde ein Plasmid-basiertes Screening-System entwickelt, das sowohl den gerichteten Einbau eines Signalpeptids von Interesse als auch des Gens eines beliebigen zu sekretierenden Zielproteins erlaubt. Der „proof of principle“ mit 41 zufällig gewählten Signalpeptiden und der α -Amylase AmyE als Reporterprotein zeigte, dass alle vorhergesagten Aminosäuresequenzen auch Signalpeptide waren und sich diese in ihrer Effizienz der Vermittlung des Proteinexports bis zu einem Faktor von 23 unterschieden. Es konnte kein offensichtlicher theoretischer Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz des Signalpeptids und Sekretionseffizienz abgeleitet werden. Die Arbeit trägt somit zur weiteren Optimierung des *B. megaterium* Proteinproduktionssystems bei.

5. Ausblick

Im angebrochenen Zeitalter der Metagenomic ist die Entwicklung von Screening-Systemen zur High-Throughput-Analyse von Genbanken von großem Interesse für Wissenschaft und auch Industrie. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit eröffnen nun erstmals eine Möglichkeit, auch *B. megaterium* auf diesem Gebiet einzusetzen. Basierend darauf ergeben sich im Wesentlichen neue Fragestellungen auf drei verschiedenen Gebieten.

1) Da die Ergebnisse der hier eingesetzten rationalen Methoden zur Analyse der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* nicht zur Verbesserung der Transformationseffizienz genutzt werden können, sollten in Zukunft ungerichtete Methoden genutzt werden. Basierend auf den Erfahrungen in *B. subtilis*, *B. licheniformis* und anderen Arten, bei denen Stämme mit hoher Transformationseffizienz jeweils als Mutanten von Wildtypstämmen identifiziert werden konnten, sollten etwa über den Ansatz der ungerichteten Mutagenese mittels UV- oder chemischer Behandlung, verbunden mit einem geeigneten Reportersystem, Erfolge erzielt werden.

2) Die Identifizierung und Sequenzierung von effizient transformierbaren Mutanten dürfte Einblicke in die Regulation der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* bringen. In diesem Zusammenhang ist auch der Wirkmechanismus der extrazellulären Protease NprM, die einen Einfluss auf die Genexpression zu haben scheint, sowie die genaue Funktion des Regulators ComK_{Bmeg} in *B. megaterium* von Interesse. Neue Erkenntnisse hinsichtlich dieser beiden Proteine dürften unser Verständnis der natürlichen Kompetenz in *B. megaterium* sowie allgemein in anderen Bakterienarten erweitern und somit zusätzlich auch ihre Anwendbarkeit als Transformationsmethode verbessern.

3) Das hier entwickelte funktionelle Signalpeptid-Testsystem sollte um die Plasmide erweitert werden, die die übrigen in *B. megaterium* identifizierten Signalpeptid-codierenden Sequenzen enthalten. Dieses System kann dann in künftigen Arbeiten zur Sekretion weiterer Proteine genutzt werden, sowie in anderen Wirten, wie *B. subtilis* oder *B. licheniformis*, getestet werden. Erste Arbeiten zu diesen Punkten werden derzeit bereits in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig durchgeführt (Frau Antonia Lakowitz, Herr Johannes Gaedeke).

6. Literaturverzeichnis

- Aich, P., Patra, M., Chatterjee, A.K., Roy, S.S., and Basu, T. (2012) Calcium chloride made *E. coli* competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. *Protein J* **31**: 366–373.
- Albano, M., Smits, W.K., Ho, L.T.Y., Kraigher, B., Mandic-Mulec, I., Kuipers, O.P., and Dubnau, D. (2005) The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions. *J Bacteriol* **187**: 2010–2019.
- Aravind, L., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Walker, D.R., and Koonin, E. V (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet* **14**: 442–444.
- Arutyunov, D., and Frost, L.S. (2013) F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* **70**: 18–32.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25–29.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J Exp Med* **79**: 137–158.
- Bach, J.N., and Bramkamp, M. (2013) Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Mol Microbiol* **88**: 1205–1217.
- Bakkali, M. (2013) Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? *Arch Microbiol* **195**: 279–289.
- Banse, A.V., Hobbs, E.C., and Losick, R. (2011) Phosphorylation of Spo0A by the histidine kinase KinD requires the lipoprotein med in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 3949–55.
- Bergé, M.J., Kamgoué, A., Martin, B., Polard, P., Campo, N., and Claverys, J.-P. (2013) Midcell recruitment of the DNA uptake and virulence nuclease, EndA, for pneumococcal transformation. *PLoS Pathog* **9**: e1003596.
- Berka, R.M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., *et al.* (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol Microbiol* **43**: 1331–1345.
- Biedendieck, R. (2006) Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Seibel, J., *et al.* (2007) Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 1062–1073.
- Biedendieck, R., Gamer, M., Jaensch, L., Meyer, S., Rohde, M., Deckwer, W.-D., and Jahn, D. (2007) A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol* **132**: 426–430.
- Biedendieck, R., Yang, Y., Deckwer, W.-D., Malten, M., and Jahn, D. (2007) Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* **96**: 525–537.

- Borgmeier, C., Biedendieck, R., Hoffmann, K., Jahn, D., and Meinhardt, F. (2011) Transcriptome profiling of *degU* expression reveals unexpected regulatory patterns in *Bacillus megaterium* and discloses new targets for optimizing expression. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 583–596.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T., and Eggert, T. (2006) Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* **362**: 393–402.
- Bunk, B. (2010) Comparative and Functional Genomics of *Bacillus megaterium* DSM319. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Burrows, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**: 878–888.
- Chen, I., and Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 241–249.
- Chen, I., Provvedi, R., and Dubnau, D. (2006) A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**: 21720–21727.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., *et al.* (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* **25**: 1007–1014.
- Chumsakul, O., Takahashi, H., Oshima, T., Hishimoto, T., Kanaya, S., Ogasawara, N., and Ishikawa, S. (2011) Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* **39**: 414–428.
- Claverys, J.-P., Martin, B., and Polard, P. (2009) The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 643–656.
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 451–475.
- Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363–378.
- Croucher, N.J., Harris, S.R., Fraser, C., Quail, M.A., Burton, J., Linden, M. van der, *et al.* (2011) Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**: 430–434.
- Dalbey, R.E., Wang, P., and Dijk, J.M. van (2012) Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **76**: 311–330.
- Dempwolff, F., Möller, H.M., and Graumann, P.L. (2012) Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *J Bacteriol* **194**: 4652–4661.
- Dogsa, I., Choudhary, K.S., Marsetic, Z., Hudaiberdiev, S., Vera, R., Pongor, S., and Mandic-Mulec, I. (2014) ComQXPA quorum sensing systems may not be unique to *Bacillus subtilis*: a census in prokaryotic genomes. *PloS One* **9**: e96122.

- Donovan, C., and Bramkamp, M. (2009) Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiol Read Engl* **155**: 1786–1799.
- Draskovic, I., and Dubnau, D. (2005) Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Mol Microbiol* **55**: 881–896.
- Dubnau, D. (1997) Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: the role of type-IV pilin-like proteins--a review. *Gene* **192**: 191–198.
- Dubnau, D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**: 217–244.
- Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R., Scher, B., and Cirigliano, C. (1973) Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J Bacteriol* **114**: 273–286.
- Duffin, P.M., and Seifert, H.S. (2010) DNA uptake sequence-mediated enhancement of transformation in *Neisseria gonorrhoeae* is strain dependent. *J Bacteriol* **192**: 4436–4444.
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M. (1984) Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **259**: 10606–10613.
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. a, Edirisinghe, J.N., Kutumbaka, K.K., Koenig, S.S.K., *et al.* (2011) Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J Bacteriol* **193**: 4199–4213.
- Fagerlund, A., Granum, P.E., and Haavarstein, L.S. (2014) *Staphylococcus aureus* competence genes: Mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing. *Mol Microbiol* 1–54.
- Fröde, D. (2008) Untersuchungen zur natürlichen Kompetenz in *Bacillus megaterium* DSM319. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Fuchs, G. (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*. 9. Auflage., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gamer, M. (2010) Directed Development of *Bacillus megaterium* for Applications in Recombinant Protein Production. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Garcia-Vallve, S., Guzman, E., Montero, M.A., and Romeu, A. (2003) HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 187–189.
- Garner, M.M., and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047–3060.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., *et al.* (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80.
- Griffith, F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113–159.

- Grossman, a D. (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **29**: 477–508.
- Hahn, J., Roggiani, M., and Dubnau, D. (1995) The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. *J Bacteriol* **177**: 3601–3605.
- Haijema, B.J., Hahn, J., Haynes, J., and Dubnau, D. (2001) A ComGA-dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Mol Microbiol* **40**: 52–64.
- Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M., and Virta, M. (2002) Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal Biochem* **301**: 235–42.
- Hames, B.D. (1998) *Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Hamoen, L.W. (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**: 9–17.
- Hamoen, L.W., Kausche, D., Marahiel, M.A., Sinderen, D. van, Venema, G., and Serror, P. (2003) The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of *comK*. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 299–304.
- Hamoen, L.W., Werkhoven, A.F. Van, Bijlsma, J.J., Dubnau, D., and Venema, G. (1998) The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T-rich sequences arranged in a unique, flexible pattern along the DNA helix. *Genes Dev* **12**: 1539–1550.
- Hamoen, L.W., Werkhoven, A.F. Van, Venema, G., and Dubnau, D. (2000) The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9246–9251.
- Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (1991) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Wiley.
- Hoa, T.T., Tortosa, P., Albano, M., and Dubnau, D. (2002) Rok (YkuW) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*. *Mol Microbiol* **43**: 15–26.
- Hoffmann, K., Wollherr, A., Larsen, M., Rachinger, M., Liesegang, H., Ehrenreich, A., and Meinhardt, F. (2010) Facilitation of direct conditional knockout of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5046–5057.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E., and Lake, J.A. (2003) Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol* **20**: 1598–1602.
- Jakobs, M., Hoffmann, K., Grabke, A., Neuber, S., Liesegang, H., Volland, S., and Meinhardt, F. (2014) Unravelling the genetic basis for competence development of auxotrophic *Bacillus licheniformis* 9945A strains. *Microbiol Read Engl* **160**: 2136–2147.
- Jakobs, M., and Meinhardt, F. (2015) What renders Bacilli genetically competent? A gaze beyond the model organism. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 1557–1570.
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., and Saxild, H.H. (2002) Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 197–200.

- Johnsborg, O., Eldholm, V., and Haa varstein, L.S. (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**: 767–778.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**: 181–196.
- Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D., and Dübel, S. (2007) Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Factories* **6**: 2.
- Juncker, A.S., Willenbrock, H., Heijne, G. Von, Brunak, S., Nielsen, H., and Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci Publ Protein Soc* **12**: 1652–1662.
- Knobloch, D., Ostermann, K., and Rödel, G. (2012) Production, secretion, and cell surface display of recombinant *Sporosarcina ureae* S-layer fusion proteins in *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 560–567.
- Koehler, T.M., and Thorne, C.B. (1987) *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *J Bacteriol* **169**: 5271–5278.
- Koonin, E.V., and Wolf, Y.I. (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* **36**: 6688–6719.
- Korneli, C., Biedendieck, R., David, F., Jahn, D., and Wittmann, C. (2013) High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 3343–3353.
- Korneli, C., David, F., Biedendieck, R., Jahn, D., and Wittmann, C. (2013) Getting the big beast to work--systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *J Biotechnol* **163**: 87–96.
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., *et al.* (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* **186**: 1084–1096.
- Kovács, A.T., Smits, W.K., Mirończuk, A.M., and Kuipers, O.P. (2009) Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environ Microbiol* **11**: 1911–1922.
- Kreft, J., Bernhard, K., and Goebel, W. (1978) Recombinant plasmids capable to replication in *B. subtilis* and *E. coli*. *Mol Gen Genet MGG* **162**: 59–67.
- Kunnimalaiyaan, M., Stevenson, D.M., Zhou, Y., and Vary, P.S. (2001) Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551. *Mol Microbiol* **39**: 1010–1021.
- Kunst, F., and Rapoport, G. (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 2403–2407.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lammers, M., Nahrstedt, H., and Meinhardt, F. (2004) The *Bacillus megaterium* *comE* locus encodes a functional DNA uptake protein. *J Basic Microbiol* **44**: 451–458.

- Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A.N., Faull, K.F., and Lazazzera, B. a (2007) Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **65**: 1321–1333.
- Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., *et al.* (2013) A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **9**: e1003473.
- Ling Lin Fu, Zi Rong Xu, Wei Fen Li, Jiang Bing Shuai, Ping Lu, and Chun Xia Hu (2007) Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv* **25**: 1–12.
- Londoño-Vallejo, J.A., and Dubnau, D. (1993) *comF*, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Mol Microbiol* **9**: 119–131.
- Londoño-Vallejo, J.A., and Dubnau, D. (1994) Membrane association and role in DNA uptake of the *Bacillus subtilis* PriA analogue ComF1. *Mol Microbiol* **13**: 197–205.
- Lozano Goné, A.M., Dinorín Téllez Girón, J., Jiménez Montejó, F.E., Hidalgo-Lara, M.E., and López Y López, V.E. (2014) Behavior of transition state regulator AbrB in batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* **69**: 725–732.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grande, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., *et al.* (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**: 365–373.
- Malten, M., Biedendieck, R., Gamer, M., Drews, A.-C., Stammen, S., Buchholz, K., *et al.* (2006) A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1677–1679.
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W.-D., and Jahn, D. (2005) Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* **89**: 206–218.
- Mathiesen, G., Sveen, a, Piard, J.-C., Axelsson, L., and Eijsink, V.G.H. (2008) Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J Appl Microbiol* **105**: 215–26.
- Meinhardt, F., Stahl, U., and Ebeling, W. (1989) Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 343–350.
- Mell, J.C., and Redfield, R.J. (2014) Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol* **196**: 1471–1483.
- Mirończuk, A.M., Kovács, Á.T., and Kuipers, O.P. (2008) Induction of natural competence in *Bacillus cereus* ATCC14579. *Microb Biotechnol* **1**: 226–235.
- Mirończuk, A.M., Mañu, A., Kuipers, O.P., and Kovács, A.T. (2011) Distinct roles of ComK1 and ComK2 in gene regulation in *Bacillus cereus*. *PLoS One* **6**: e21859.
- Mirouze, N., Desai, Y., Raj, A., and Dubnau, D. (2012) Spo0A~P imposes a temporal gate for the bimodal expression of competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **8**: e1002586.

- Mishima, M., Shida, T., Yabuki, K., Kato, K.-I., Sekiguchi, J., and Kojima, C. (2005) Solution structure of the peptidoglycan binding domain of *Bacillus subtilis* cell wall lytic enzyme CwlC: characterization of the sporulation-related repeats by NMR. *Biochemistry (Mosc)* **44**: 10153–10163.
- Moro, A., Sánchez, J., and Serguera, C. (1995) Transformation of *Bacillus megaterium* by electroporation. *Biotechnol Tech* **9**: 589–590.
- Muschiol, S., Balaban, M., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2015) Uptake of extracellular DNA: Competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *BioEssays*
- Näveke, R., and Tepper, K.P. (1979) *Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden: mit Praktikumsaufgaben ; 4 Tabellen*. Fischer.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., *et al.* (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323–329.
- Nijland, R., Burgess, J.G., Errington, J., and Veening, J.-W. (2010) Transformation of environmental *Bacillus subtilis* isolates by transiently inducing genetic competence. *PLoS One* **5**: e9724.
- Norman, A., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2275–2289.
- Palmer, T., and Berks, B.C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiol Read Engl* **149**: 547–556.
- Panbangred, W., Weeradechapon, K., Udomvaraphant, S., Fujiyama, K., and Meevootisom, V. (2000) High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant. **991**: 152–157.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**: 785–786.
- Popa, O., and Dagan, T. (2011) Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **14**: 615–623.
- Provvedi, R., and Dubnau, D. (1999) ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **31**: 271–280.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**: 89–92.
- Quentin, Y., Fichant, G., and Denizot, F. (1999) Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol* **287**: 467–484.
- Rahman, O., Cummings, S.P., Harrington, D.J., and Sutcliffe, I.C. (2008) Methods for the bioinformatic identification of bacterial lipoproteins encoded in the genomes of Gram-positive bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 2377–2382.
- Ravinskaya, K. (2011) Transkonjugation als Transformationsmethode für *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.

- Redfield, R.J. (1993) Evolution of natural transformation: testing the DNA repair hypothesis in *Bacillus subtilis* and *Haemophilus influenzae*. *Genetics* **133**: 755–761.
- Rial, D.V., and Ceccarelli, E.A. (2002) Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expr Purif* **25**: 503–507.
- Richhardt, J., Larsen, M., and Meinhardt, F. (2010) An improved transconjugation protocol for *Bacillus megaterium* facilitating a direct genetic knockout. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1959–1965.
- Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F.I.J., and Diaz, P. (2002) Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol Lett* **217**: 263–267.
- Rygus, T., and Hillen, W. (1991) Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**: 594–599.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanders, C., Wethkamp, N., and Lill, H. (2001) Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Mol Microbiol* **41**: 241–246.
- Schaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J.P. (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 704–711.
- Schultz, D., Wolynes, P.G., Jacob, E. Ben, and Onuchic, J.N. (2009) Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21027–21034.
- Serror, P., and Sonenshein, A.L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J Bacteriol* **178**: 5910–5915.
- Shank, E.A., and Kolter, R. (2011) Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **14**: 741–747.
- Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L., and Sanford, J.C. (1991) Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 480–485.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., *et al.* (2014) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539–539.
- Slonczewski, J.L., and Foster, J.W. (2012) *Mikrobiologie*. 2. Auflage., Springer Spektrum, Berlin ; Heidelberg.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31–40.
- Smith, H.O., Gwinn, M.L., and Salzberg, S.L. (1999) DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res Microbiol* **150**: 603–616.
- Smith, T.J., and Foster, S.J. (1995) Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **177**: 3855–3862.

- Smits, W.K., Eschevins, C.C., Susanna, K. a, Bron, S., Kuipers, O.P., and Hamoen, L.W. (2005) Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Mol Microbiol* **56**: 604–614.
- Sparling, P.F. (1966) Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J Bacteriol* **92**: 1364–1371.
- Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 1072–1078.
- Stammen, S. (2010) Genetic tools for high yield protein production with *Bacillus megaterium*. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Stammen, S., Müller, B.K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E., and Jahn, D. (2010) High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4037–4046.
- Stevens, K.E., Chang, D., and Zwack, E.E. (2011) Competence in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated by the Rate of Ribosomal Decoding Errors.
- Susanna, K. a, Fusetti, F., Thunnissen, A.-M.W.H., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. (2006) Functional analysis of the competence transcription factor ComK of *Bacillus subtilis* by characterization of truncation variants. *Microbiol Read Engl* **152**: 473–83.
- Susanna, K. a, Mironczuk, A.M., Smits, W.K., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. (2007) A single, specific thymine mutation in the ComK-binding site severely decreases binding and transcription activation by the competence transcription factor ComK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 4718–28.
- Susanna, K.A., Werff, A.F.V.D., Hengst, C.D.D., Calles, B., Salas, M., Venema, G., *et al.* (2004) Mechanism of Transcription Activation at the *comG* Promoter by the Competence Transcription Factor ComK of *Bacillus subtilis*. **186**: 1120–1128.
- Sysoeva, T.A., Bane, L.B., Xiao, D.Y., Bose, B., Chilton, S.S., Gaudet, R., and Burton, B.M. (2014) Structural characterization of the late competence protein ComFB from *Bacillus subtilis*. *Biosci Rep* .
- Takeno, M., Taguchi, H., and Akamatsu, T. (2012) Role of ComEA in DNA uptake during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng* **113**: 689–693.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 523–533.
- Tersch, M.A. Von, and Robbins, H.L. (1990) Efficient cloning in *Bacillus megaterium*: comparison to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cloning hosts. *FEMS Microbiol Lett* **58**: 305–309.
- Thorne, C.B., and Stull, H.B. (1966) Factors affecting transformation of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* **91**: 1012–1020.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., *et al.* (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **68**: 207–233.
- Tjalsma, H., Bolhuis, a, Jongbloed, J.D., Bron, S., and Dijk, J.M. van (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **64**: 515–547.

- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., and Dubnau, D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* **17**: 6730–6738.
- Uliczka, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T., and Dersch, P. (2011) Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PloS One* **6**: e20425.
- Vary, P.S. (1994) Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiol Read Engl* **140 Pt 5**: 1001–1013.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D., and Jahn, D. (2007) *Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 957–67.
- Wienecke, S. (2012) Produktion, Reinigung und *in vivo* und *in vitro* Analysen von ComK aus *Bacillus megaterium*. Masterarbeit, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Wittchen, K.D., and Meinhardt, F. (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 871–877.
- Wozniak, R.A.F., and Waldor, M.K. (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**: 552–563.
- Yamane, K., Bunai, K., and Kakeshita, H. (2004) Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 2007–2023.
- Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., and Deckwer, W.-D. (2006) High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Factories* **5**: 36.
- Yang, Y.H., and Paquet, A.C. (2005) Preprocessing Two-Color Spotted Arrays. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Gentleman, R., Carey, V.J., Huber, W., Irizarry, R.A., and Dudoit, S. (eds). Springer New York, pp. 49–69 http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-29362-0_4. Accessed February 10, 2015.
- Zeigler, D.R., Prágai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., et al. (2008) The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol* **190**: 6983–95.
- Zhou, J., Liu, H., Du, G., Li, J., and Chen, J. (2012) Production of α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus megaterium* MS941 by systematic codon usage optimization. *J Agric Food Chem* **60**: 10285–10292.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Verwendete Primer für die Amplifizierung der Signalpeptidsequenzen.

SP = Nummer des Signalpeptids

SP	Primernamen	Sequenz (5'→3')
lipA	primerTK83fw_LipA_SP-Testsystem	atcatgtacaatgaaaa aagtattaatggcttc
	primerTK84rev_LipA_SP-Testsystem	atcatagccggcggcgc tagcacctgatg
1	primerSP1_fw_gi 294802488 gb ADF39554.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa agacaatgattacg
	primerSP2_rev_gi 294802488 gb ADF39554.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcgagctg atgcaccacttgc
2	primerSP3_fw_gi 294802722 gb ADF39788.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgatgaa attaag
	primerSP4_rev_gi 294802722 gb ADF39788.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcgccgatt tgcaatagtgc
3	primerSP5_fw_gi 294801689 gb ADF38755.1 putative peptidoglycan binding domain protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgttaa gaaaaaacac
	primerSP6_rev_gi 294801689 gb ADF38755.1 putative peptidoglycan binding domain protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcgagctg cttcactagtgg
4	primerSP7_fw_gi 294803324 gb ADF40390.1 putative protease, NlpC/P60 family [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgctaaa gaaagcaaatcg
	primerSP8_rev_gi 294803324 gb ADF40390.1 putative protease, NlpC/P60 family [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcact tgctgaagtgtgc
5	primerSP9_fw_gi 294802196 gb ADF39262.1 putative lipoprotein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa agttatattctgc
	primerSP10_rev_gi 294802196 gb ADF39262.1 putative lipoprotein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgaac aagccgttagtgtac
6	primerSP11_fw_gi 294801808 gb ADF38874.1 sulfur-containing amino acid ABC transporter, sulfur-containing amino acid-binding protein TcyK [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa aactacagctgac
	primerSP12_rev_gi 294801808 gb ADF38874.1 sulfur-containing amino acid ABC transporter, sulfur-containing amino acid-binding protein TcyK [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcgccgtgt ttctttatttggtg
8	primerSP15_fw_gi 294801140 gb ADF38206.1 putative lipoprotein YlaJ [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaca aatttttctatcc
	primerSP16_rev_gi 294801140 gb ADF38206.1 putative lipoprotein YlaJ [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcttg gttattgttacagc
9	primerSP17_fw_gi 294802321 gb ADF39387.1 hypothetical protein BMD_2542 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaccaa acgaatgataac
	primerSP18_rev_gi 294802321 gb ADF39387.1 hypothetical protein BMD_2542 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcca atgaggtttgtgac
10	primerSP19_fw_gi 294800202 gb ADF37268.1 Beta-amylase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaac agctatgtaaaaaagg
	primerSP20_rev_gi 294800202 gb ADF37268.1 Beta-amylase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcggcag ccgctccgttaattgg
11	primerSP21_fw_gi 294800136 gb ADF37202.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacattgaaaa gatattgttac
	primerSP22_rev_gi 294800136 gb ADF37202.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcac acgctgaagtac
12	primerSP23_fw_gi 294800047 gb ADF37113.1 spore germination protein GerD [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa agcgactcatgc
	primerSP24_rev_gi 294800047 gb ADF37113.1 spore germination protein GerD [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcac aggctgtagctaaaagc
13	primerSP25_fw_gi 294802151 gb ADF39217.1 putative ABC transporter, substrate-binding protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa agacaaatttaac

	primerSP26_rev_gi 294802151 gb ADF39217.1 putative ABC transporter, substrate-binding protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcctttccc gcacacc
14	primerSP27_fw_gi 294800199 gb ADF37265.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgatgaa acctatagtgc
	primerSP28_rev_gi 294800199 gb ADF37265.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcagcttc agccgctgctgc
15	primerSP29_fw_gi 294801329 gb ADF38395.1 levansucrase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaat gaaacgagtgctgc
	primerSP30_rev_gi 294801329 gb ADF38395.1 levansucrase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcagcaa atgtttgatatcc
16	primerSP31_fw_gi 294804116 gb ADF41182.1 peptidase, M23/M37 family [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgattga cgtgttaagaag
	primerSP32_rev_gi 294804116 gb ADF41182.1 peptidase, M23/M37 family [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgctttt accatttgc
17	primerSP33_fw_gi 294801731 gb ADF38797.1 polysaccharide deacetylase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacattgaacca gcgatttaaacc
	primerSP34_rev_gi 294801731 gb ADF38797.1 polysaccharide deacetylase [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcggttc acttcctttgg
18	primerSP35_fw_gi 294803018 gb ADF40084.1 putative lipoprotein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaga aaaaagcatttgg
	primerSP36_rev_gi 294803018 gb ADF40084.1 putative lipoprotein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcactgc aggcacctaaaatg
19	primerSP37_fw_gi 294802971 gb ADF40037.1 hypothetical protein BMD_3197 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa aagcgacatcc
	primerSP38_rev_gi 294802971 gb ADF40037.1 hypothetical protein BMD_3197 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcagcgc atactcctctaacc
20	primerSP39_fw_gi 294801780 gb ADF38846.1 pullulanase, type I [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgataac gctttcaaaaagg
	primerSP40_rev_gi 294801780 gb ADF38846.1 pullulanase, type I [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggcgctctgc tgcatatgcaaacg
21	primerSP41_fw_gi 294800406 gb ADF37472.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgagca gaatgaaaaaactagc
	primerSP42_rev_gi 294800406 gb ADF37472.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctcctga atatggagtaacaag
22	primerSP43_fw_gi 294801708 gb ADF38774.1 hypothetical protein BMD_1921 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa aagtattagtgcg
	primerSP44_rev_gi 294801708 gb ADF38774.1 hypothetical protein BMD_1921 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctcctgtt gctacgcttgttc
24	primerSP47_fw_gi 294803689 gb ADF40755.1 hypothetical protein BMD_3923 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa ggatgcgagc
	primerSP48_rev_gi 294803689 gb ADF40755.1 hypothetical protein BMD_3923 [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcata ccctgaacctac
26	primerSP51_fw_gi 294802994 gb ADF40060.1 spore cortex-lytic enzyme [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacagtgaagaa aaaacgtg
	primerSP52_rev_gi 294802994 gb ADF40060.1 spore cortex-lytic enzyme [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgctga tgctgtccttgac
27	primerSP53_fw_gi 294802786 gb ADF39852.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacattgaaaag ctatcgtttag
	primerSP54_rev_gi 294802786 gb ADF39852.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggccgcac tagatgtatctg
28	primerSP55_fw_gi 294803313 gb ADF40379.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa ggttcaaaaagag
	primerSP56_rev_gi 294803313 gb ADF40379.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgctct gcaactgtttgc
29	primerSP57_fw_gi 294803554 gb ADF40620.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacaatgaaaat gaaacaacg
	primerSP58_rev_gi 294803554 gb ADF40620.1 conserved hypothetical protein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatagccggctgcata tgctggtgtatc
30	primerSP59_fw_gi 294801877 gb ADF38943.1 putative lipoprotein [<i>Bacillus megaterium</i> DSM-319]	atcatgtacagtgaaga aacgaccc

	primerSP60_rev_gi 294801877 gb ADF38943.1 putative lipoprotein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgcac atcattgtgg
31	primerSP61_fw_gi 294802643 gb ADF39709.1 putative oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgagaa aaaggataag
	primerSP62_rev_gi 294802643 gb ADF39709.1 putative oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcagagtt agccgaacatgc
32	primerSP63_fw_gi 294802990 gb ADF40056.1 putative ferrichrome ABC transporter, ferrichrome-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacagtgaaaa aagtgttag
	primerSP64_rev_gi 294802990 gb ADF40056.1 putative ferrichrome ABC transporter, ferrichrome-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgctcc ttgattacc
33	primerSP65_fw_gi 294800621 gb ADF37687.1 conserved hypothetical protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacagtgaaaa aaatattggc
	primerSP66_rev_gi 294800621 gb ADF37687.1 conserved hypothetical protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgcaa acgcagtag
35	primerSP69_fw_gi 294801302 gb ADF38368.1 ferrichrome import ABC transporter, ferrichrome-binding protein FhuD [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa aattactgcttc
	primerSP70_rev_gi 294801302 gb ADF38368.1 ferrichrome import ABC transporter, ferrichrome-binding protein FhuD [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcgcttttg cttcagttgaacc
36	primerSP71_fw_gi 294801196 gb ADF38262.1 sporulation lipoprotein, YhcN/YlaJ family [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaaga aatcggttttg
	primerSP72_rev_gi 294801196 gb ADF38262.1 sporulation lipoprotein, YhcN/YlaJ family [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcaccttg atctgctgtg
37	primerSP73_fw_gi 294803273 gb ADF40339.1 putative lipoprotein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaaga aatttatggtgg
	primerSP74_rev_gi 294803273 gb ADF40339.1 putative lipoprotein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggccttgcta gcagagtttgagc
39	primerSP77_fw_gi 294804812 gb ADF41878.1 cytochrome c-551 [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacattgaaaaa agtattactgacg
	primerSP78_rev_gi 294804812 gb ADF41878.1 cytochrome c-551 [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgcact cgctgaagattcacc
42	primerSP83_fw_gi 294801465 gb ADF38531.1 hypothetical protein BMD_1675 [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaataa attaacaaaaacaagc
	primerSP84_rev_gi 294801465 gb ADF38531.1 hypothetical protein BMD_1675 [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcctttcc actttcgcaagc
43	primerSP85_fw_gi 294802235 gb ADF39301.1 methyl-accepting chemotaxis protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatggaga gagtaag
	primerSP86_rev_gi 294802235 gb ADF39301.1 methyl-accepting chemotaxis protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcagctg atacacctatcg
44	primerSP87_fw_gi 294803259 gb ADF40325.1 bacterial SH3 domain protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgacag aagtgaacagac
	primerSP88_rev_gi 294803259 gb ADF40325.1 bacterial SH3 domain protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgcgct tgcgacagttgg
45	primerSP89_fw_gi 294802922 gb ADF39988.1 transcription regulator domain protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaaaa aatacaaaataggg
	primerSP90_rev_gi 294802922 gb ADF39988.1 transcription regulator domain protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcagcag atgtttcctgttg
47	primerSP93_fw_gi 294804454 gb ADF41520.1 penicillin-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgagac gaattgggtgg
	primerSP94_rev_gi 294804454 gb ADF41520.1 penicillin-binding protein [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggctgcttc tgttgatcatttgagc
48	primerSP95_fw_gi 294800998 gb ADF38064.1 spore germination protein GerA [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatgtacaatgaaga gaatactattttatgc
	primerSP96_rev_gi 294800998 gb ADF38064.1 spore germination protein GerA [Bacillus megaterium DSM-319]	atcatagccggcacggt ctgcacagctcgttaag

Danksagung

An dieser Stelle sei einer ganzen Reihe von Personen gedankt, die auf die eine oder andere Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dieter Jahn sei für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen sowie für die Übernahme des Hauptreferats gedankt.

Für die freundliche Übernahme des Korreferates danke ich Prof. Dr. Michael Steinert und Prof. Dr. André Fleißner für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein riesengroßes DANKESCHÖN geht natürlich an Dr. Rebi, nicht nur für die fachlich/wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und Betreuung in den letzten Jahren, dem fleißigen Korrekturlesen dieser Arbeit, viele viele andere Sachen, sondern vor allem auch für den stetigen vollen Einsatz und das immer und viel investierte Herzblut, sowohl zu meinem, als auch zum Wohle der gesamten Arbeitsgruppe und eigentlich auch aller anderen existierenden Personen.

Meinen beiden Labormädels Conny und Sarah gebührt ebenfalls ein riesengroßer Dank! Nicht nur für die stetige Hilfsbereitschaft bei der täglichen Laborarbeit, wissenschaftlichen Diskussionen und Rücksichtnahme bei eventuellen kreativ-organisatorischen Defiziten meinerseits (selbstverständlich nur bei nicht arbeitsrelevanten Themen), sondern auch und besonders für die überaus angenehme, unkomplizierte und amüsante zwischenmenschliche Interaktion.

Explizit sei noch Dr. Boyke Bunk von der DSMZ für die Unterstützung bei der bioinformatischen Thematik gedankt, sowie allen Angehörigen des Instituts für Mikrobiologie, die für eine ausgesprochen angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre gesorgt habe und das Institut überhaupt erst am Laufen halten. Besonders freue ich mich hierbei darüber, dass aus so manchem Kollegen/Kollegin auf dem Weg ein/e gute/r Freund/in geworden ist.

Last but definitely not least, möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich, meist wohl ohne so ganz genau zu wissen was ich hier eigentlich so mache, mein ganzes Leben lang voll und ganz unterstützt haben, sowohl moralisch als auch finanziell, und damit im Grunde nicht nur zu dieser Arbeit beigetragen, sondern sie überhaupt erst in den Bereich des Möglichen gerückt haben. Danke!!